

**Efeito do Bloqueio de Receptores de
Mineralocorticoide nas Alterações Vasculares
Induzidas Pela Ovariectomia em Vasos de
Condutância e Resistência de Ratas**

Wena Dantas Marcarini

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Cardiovascular

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Maio 2017

Efeito do Bloqueio de Receptores de Mineralocorticoide nas Alterações Vasculares Induzidas Pela Ovariectomia em Vasos de Condutância e Resistência de Ratas

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, em cumprimento às exigências parciais para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Alessandra Simão Padilha

Co-orientador: Dr^a. Rogério Faustino Ribeiro

Vitória, Maio 2017

Marcarini, Wena Dantas 1991

Papel da Aldosterona nas Alterções Funcionais nos Vasos de Condutância e Resistência em Ratas Ovariectomizadas [Vitória] 2017

108pp, 29,7cm (UFES, M. SC., Ciências Fisiológicas, 2017)

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Simão Padilha

1. Ovariectomia 2. Estresse oxidativo 3. Reatividade vascular 4. Aorta 5. Mesentérica 6. Espironolactona

Àqueles que me apoiam e me encorajam sempre.

Meus pais, minha família e meus anjos.

“Enquanto houver vontade de lutar haverá esperança de vencer”

Santo Agostinho

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar e guiar sempre os meus passos, por me encorajar a continuar e por ter me dado o presente mais lindo da minha vida: meus pais.

A minha mãe que é meu espelho, que é a pessoa mais importante da minha vida, que com certeza sorriu e sofreu comigo. Obrigada por ser essa mãe maravilhosa e saber que sempre posso contar com você. Inexplicável o amor e a admiração que tenho por ti.

Ao meu pai, nossa que saudade, que vontade de te dar um abraço e falar: pai eu consegui, venci mais um obstáculo. Sei que está sempre comigo, e no dia da minha defesa não vai ser diferente, estará do meu lado me encorajando e com muito orgulho de mim, afinal só não posso te vê, mas sinto perfeitamente a sua presença em mim. Aos meus anjos “Enquanto houver vocês do outro lado, aqui do outro eu consigo me orientar”.

A toda minha família, em especial Tia Rene, saiba que sua mensagem todos os dias de manhã falando: Deus te abençoe, me dava força pra vencer mais um dia. Tia Mica pelo carinho e atenção em todos os momentos, as madrugadas acordada comigo para estudar para o mestrado. Larissa por ser essa pessoa iluminada que amo tanto, e que está sempre comigo mesmo distante. Tia Karina por ser essa pessoa bondosa, um coração enorme, obrigada por torcer por mim e acreditar que eu venceria.

As meninas da república: Cecília, Carol, Emanuely e Katia, obrigada por estarem comigo me dando força, pelos momentos de descontração, de estudo. Tenho certeza que essa caminhada não poderia ter sido melhor. Vocês são as irmãs que Deus me deu.

A tia Marinete por ter cuidado de mim tão bem no decorrer do ano passado, ter me tratado como uma filha, sou muito grata a ti, não imagino como retribuir tamanho gesto bondoso que teve comigo. Thais, independente de qualquer

coisa não poderia deixar de agradecer as noites em claro, sentada do meu lado me apoiando, dedico essa vitória a vocês também.

A minha orientadora Dr^a Alessandra Padilha, uma “mãe científica”, sem dúvida não tenho palavras pra agradecer todos os ensinamentos, a paciência, os conselhos, Deus me deu a honra de poder passar esses dois anos ao lado de uma pessoa tão abençoada quanto você...meu muito Obrigada.

Ao meu co-orientador Dr^o Rogério Faustino obrigada pelas ideias, questionamentos, e pelas tantas dúvidas esclarecidas, foi de suma importância nessa trajetória no LEMC.

Aos professores do LEMC Dr^o Leonardo dos Santos, Dr^o Dalton Vassalo, Dr^a Ivanita Stefanon, Dr^a Paula Frizzera pelos momentos de aprendizado e convívio no decorrer desses dois anos.

Ao Prof Dr^o Valério pela paciência e tempo concedido para me ensinar western blot.

A grande família LEMC: Sabrina, Vinicius, Tatiana, Igor, Cindy, Marito, Priscila, Elis, Daniel, Gilson, Rebeca, Camila, Thiago, Nathalia, Felipe, Cleydi, Samya, Gersica, Mayla, Bianca, Paula, Bruno, Filipe, Patrícia, Karoline, Grazielle, Karol... Em especial a Renatinha obrigada pelas tardes de bate papo e sem dúvida os melhores conselhos, meu muito obrigada por mesmo distante se fazer presente em minha vida. Bruninha uma amiga sincera, desejo que seu caminho seja brilhante, Emily agradecer pelas caronas, pelas histórias malucas e claro sua amizade é muito importante pra mim, Priscila Tosta por ser essa amiga incrível, que tive a honra de conhecer.

Aos colegas de outros laboratórios: Marquinho sempre com sua boa vontade de me ajudar. Girlândia por me ajudar a fazer ovariectomia, Gi você é uma pessoa incrível.

Vinícius eu gastaria uma folha se fosse descrever o quanto sou grata a Deus por ter colocado você em minha vida, uma pessoa que me estendeu a mão na hora que eu precisei, acho que não teria palavra melhor que OBRIGADA... obrigada por saber que posso contar com você, obrigada por ser um irmão.

Ao pessoal do projeto espiro: David mesmo me enrolando, muitas vezes, mas não consigo deixar de amar, Ariane você sem dúvida foi muito importante para que eu chegasse até aqui, Dieli aquela pessoa que me ajudou desde primeiro dia de mestrado até hoje, sempre me atendendo com a maior paciência, sou muito grata por todo ensinamento, você é uma pessoa iluminada.

Aos funcionários e professores do Programa, pela prontidão e ensinamentos compartilhados.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 ENDOTÉLIO VASCULAR	22
1.2 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL.....	24
1.2.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO's)	24
1.2.2 PROSTANÓIDES	26
1.3 ESTROGÊNIO	27
1.4 DEFICIÊNCIA DE ESTROGÊNIO.....	30
1.5 ALDOSTERONA	31
2 JUSTIFICATIVA	35
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL:	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	37
4.2. MODELO EXPERIMENTAL	37
4.2.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO (OVARECTOMIA E SHAM).....	38
4.2.2 AVALIAÇÃO DO CICLO ESTRAL PELO ESFREGAÇO VAGINAL ..	39
4.3 MEDIDA DIRETA DE PARÂMETROS HEMODINÂMICOS	39
4.4 RETIRADA E PESAGEM DOS ÓRGÃOS	40
4.5 REATIVIDADE VASCULAR.....	41
4.5.1 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR – AORTA	41
4.5.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR - ARTÉRIA MESENTÉRICA	45
4.6 FLUORESCÊNCIA PRODUZIDA PELA OXIDAÇÃO DO DIHIDROETÍDEO (DHE).....	47
4.7 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE WESTERN BLOT	48
4.7.1 Eletroforese e transferência das amostras	49
4.7.2 Transferência das proteínas	49
4.7.3 Incubação dos anticorpos	49
4.8 MEDIDA DE PRODUÇÃO DE MALONDIALDEÍDO (MDA) NO PLASMA	50

4.9 EXPRESSÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	51
4.10 FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS	52
5. RESULTADOS	54
5.1 PESO CORPORAL	54
5.1.2 PESO DO ÚTERO	54
5.2 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA	55
5.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM ESPIRONOLACTONA SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA E DE ARTÉRIA DE RESISTÊNCIA DE FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS	55
5.4 AVALIAÇÃO DAS VIAS ENDOTELIAIS NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA EM ANÉIS DE AORTA	57
5.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM ESPIRONOLACTONA SOBRE O RELAXAMENTO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA E DE ARTÉRIA DE RESISTÊNCIA DE FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS.....	58
5.6 EFEITOS DA ESPIRONOLACTONA SOBRE A RESPOSTA DILATADORA AO NITROPRUSSATO DE SÓDIO (NPS) EM AORTA E ARTÉRIA MESENTÉRICA.....	60
5.7 EFEITO DOS FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO TRATAMENTO COM ESPIRONOLACTONA SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA.....	61
5.7.1 Participação do Óxido Nítrico na Resposta Vasoconstritora à Fenilefrina em Anéis Isolados de Aorta e de Artéria de Resistência de Fêmeas Ovariectomizadas	61
5.7.2 Participação de Espécies Reativas de Oxigênio na Resposta Vasoconstritora à Fenilefrina em Anéis Isolados de Aorta e de Artéria de Resistência de Fêmeas Ovariectomizadas	63
5.8 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO ($O_2^{\cdot-}$) <i>IN SITU</i> ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA PRODUZIDA PELA OXIDAÇÃO DO DIHIDROETÍDIO (DHE)	70
5.9 EXPRESSÃO GÊNICA DE NOX4, gp91phox e SOD EM AORTA E EM MESENTÉRICA	71
5.10 ANÁLISE MALONDIALDEÍDO	74
6. DISCUSSÃO	75
6.1 EFEITO DA DEFICIÊNCIA DE ESTROGÊNIO SOBRE PARÂMETROS PONDERAIS.....	76
6.2 EFEITO DA DEFICIÊNCIA DE ESTROGÊNIO SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL	76

6.3 EFEITO DA ESPIRONOLACTONA SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA.....	77
6.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM ESPIRONOLACTONA SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE E INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO	79
6.5 FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NA OVX E O TRATAMENTO COM ESPIRONOLACTONA SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA	81
6.5.1 Participação da Via do Óxido nítrico em Anéis de Aorta e Mesentéricas de Ratas	81
6.5.2 O Papel das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) na Reatividade Vascular em Artérias Aortas e Mesentéricas de Ratas.....	83
6.5.3 O Papel dos Prostanóides Derivados da Ciclooxigenase (cox) sobre a Reatividade Vascular em Artérias Aortas e Mesentéricas de Ratas	86
6.6 EFEITO DO TRATAMENTO COM ESPIRONOLACTONA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO PLASMÁTICO	87
7. CONCLUSÃO.....	89
8. REFERÊNCIAS.....	90

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Comparação do peso corporal (em gramas), N=6 para todos os grupos.....	54
Tabela 2: Comparação do peso do útero (em gramas) entre os grupos.....	54
Tabela 3: Valores da pressão arterial sistólica (PAS) obtidos por meio de hemodinâmica em ratas dos grupos Sham, Ovx, Sham Espiro e Ovx Espiro após dois meses de tratamento, N=6 para todos os grupos.....	55
Tabela 4– Valores de pD2 e Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina (Fe, 0,1 nM – 0,3 mM) em anéis de aorta e mesentérica.....	56
Tabela 5– Valores de pD2 e Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina (Fe, 0,1 nM – 0,3 mM) em anéis de aorta com e sem endotélio.....	58
Tabela 6 – Valores de pD2 e Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta e mesentérica.....	59
Tabela 7- Valores de pD2 e Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à NPS em anéis de aorta e mesentérica.....	60
Tabela 8 – Valores de Rmax e PD ₂ obtidos das curvas de fenilefrina (0,1 nM – 0,3 mM) de aorta de ratas, na ausência (Fenil controle, ct) ou na presença dos antioxidantes l-name, tiron, apocinina, catalase e indometacina.....	68
Tabela 9– Valores de Rmax obtidos das curvas de fenilefrina (0,1 nM – 0,3 mM) de mesentérica de ratas, na ausência (Fenil controle, ct) ou na presença dos antioxidantes l-name, tiron, apocinina, catalase e indometacina.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fatores vasodilatadores e vasoconstritores derivados do endotélio e sua ação no músculo liso vascular.....	23
Figura 2 – Representação esquemática das isoformas da NADPH oxidase na parede do vaso sanguíneo.....	25
Figure 3- Mecanismo de ativação do Óxido Nítrico sintase pelo estrôgênio em células endoteliais e células musculares lisas.....	28
Figura 4: Efeito vascular da aldosterona.....	33
Figura 5: Aorta torácica, de rato Wistar.....	42
Figura 6: Esquema sobre a preparação experimental dos anéis de aorta em banho de órgãos para a realização de estudos de reatividade vascular <i>in vitro</i>	42
Figura 7: Fotografia do leito mesentérico mostrando as artérias com suas ramificações.....	45
Figura 8: Resposta contrátil induzida por fenilefrina, em segmentos de artéria aorta torácica e artérias mesentéricas de resistência de ratas dos grupos controle (Sham) e tratado com espiro.....	56
Figura 9: Curvas concentração-resposta à fenilefrina realizadas em anéis de aorta com presença (E+) ou ausência de endotélio (E+) em ratas dos grupos controle Sham e Ovx, tratados Sham Espiro, Ovx Espiro.....	58
Figura 10: Resposta dilatadora induzida pela acetilcolina (ACh) em segmentos de artéria aorta e artéria mesentérica de ratos dos grupos Sham e Ovx.....	59

Figura 11: Resposta dilatadora induzida pelo nitroprussiato de sódio (NPS) em segmentos de artéria aorta (A) e artéria mesentérica (B) de ratos dos grupos controle e tratado.....60

Figura 12: Efeito do L-NAME (100 µM), inibidor da sintase do óxido nítrico, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de aorta e artérias mesentérica de resistência de ratas dos grupos controle Sham e Sham +LNAME, Ovx cmc e Ovx +LNAME, e tratados: Sham Espiro e Sham Espiro+LNAME, Ovx Espiro e Ovx Espiro+LNAME.....62

Figura 13: Efeito do Tiron (1 mM), varredor de ROS, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de aorta e artérias mesentérica de resistência de ratas dos grupos controle Sham e Sham+Tiron, Ovx e Ovx+Tiron,e tratados: Sham Espiro e Sham Espiro+Tiron, Ovx espiro e Ovx Espiro+Tiron.....64

Figura 14: Efeito do Apocinina scavenge de NADPH, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de aorta e artérias mesentérica de resistência de ratas dos grupos controle Sham e Sham+Apocinina, Ovx e Ovx+Apocinina,e tratados: Sham Espiro e Sham Espiro+Apocinina, Ovx Espiro e Ovx Espiro+Apocinina.....65

Figura 15: Efeito do Catalase inibidor da H₂O₂, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de aorta e artérias mesentérica de resistência de ratas dos grupos controle Sham e Sham+Catalase, Ovx e Ovx+Catalase,e tratados: Sham Espiro e Sham Espiro+Catalase, Ovx Espiro e Ovx Espiro+Catalase.....66

Figura 16: Efeitos da indometacina (10 µM), inibidor da ciclooxigenase, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (Fe) em segmentos de aorta e artérias mesentéricas de ratas dos grupos controle Sham e Sham+INDO, Ovx e Ovx+INDO,e tratados Sham Espiro e Sham Espiro+INDO, Ovx Espiro e Ovx espiro+INDO.....68

Figura 17: Imagens de micrografia representam a fluorescência emitida por dihidroetídio em segmentos de ratas dos grupos Ovx, Sham, Ovx Espiro e Sham Espiro.....71

Figura 18: Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão de gp91phox, NOX 4, SOD e da β -actina.....74

Figura 19: Medida da produção de MDA plasmática do grupo sham cmc, ovx cmc e sham espiro, ovx espiro.....74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

Angio II: Angiotensina II

BH₄: Tetrahidrobiopterina

cGMP: GMPc: 3,5 – monofosfato cíclico de guanosina

CMC: Carboximetilcelulose

COX: Ciclooxygenases

dAUC: Área abaixo da curva

DHE: Dihidroetídeo

E-: Sem endotélio

E+: Endotélio íntegro

E2: Estrogênio

ECA: Enzima Conversora de Angiotensina

EDHF: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

ERO's: Espécies Reativas de Oxigênio

ERs: Receptores de estrogênio

ET-1: Endotelina-1

FAD: Flavina adenina dinucleotídeo

FC: Frequência cardíaca

FMN: Flavina mononucleotídeo

GCs : Guanilato ciclase solúvel

cGMP: 3,5 – monofosfato cíclico de guanosina

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HA : Hipertensão arterial

HOCl: Ácido hipocloroso

i.m: Intramuscular

i.p: Intraperitoneal;

L-NAME: NG-nitro-L-arginina metil éster

LOOH: Hidroperóxidos lipídicos

MDA: Malondialdeído

MR: Receptores mineralocorticóides

NADPH: Adenina dinucleotídeo fosfato

NO: Óxido Nítrico

NPS: Nitroprussiato de sódio

O₂: Sem radicais oxigênio atômico

O₂^{•-}: Ânion superóxido

OH: Hidroxila

ONOO⁻: Peróxido nitrito

OVX: Ovariectomia

PA: Pressão arterial

PGD₂: Prostaglandina D2

PGE₂: Prostaglandina E2

PGF₂α: Prostaglandina F2α

PGI₂: Prostaciclina

RVP: Resistência vascular periférica

SRA: Sistema Renina Angiotensina

RESUMO

As doenças cardiovasculares são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em mulheres na pós-menopausa devido a ausência do papel cardioprotetor do estrogênio. A deficiência estrogênica está relacionada com a disfunção endotelial e ao aumento do estresse oxidativo. Ao mesmo tempo, trabalhos demonstram que o bloqueio de receptores de mineralocorticoides reduz o estresse oxidativo presente em algumas doenças cardiovasculares, em modelo animal. Assim o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do bloqueio de receptores MR sobre a função vascular de artérias de condutância e resistência isoladas de ratas ovariectomizadas, com foco na biodisponibilidade de NO e estresse oxidativo. Os animais foram separados em 4 grupos experimentais: Sham e Ovx, tratadas com veículo carboximetilcelulose (0,5% administrado 0,3ml via gavagem); Sham Espiro e Ovx Espiro, tratados com espironolactona (80 mg/Kg dissolvida em carboximetilcelulose, via gavagem). Todos os protocolos de tratamento foram mantidos por 8 semanas. Foram realizadas medidas de pressão arterial em animais anestesiados ao final do experimento e a função vascular foi investigada através de estudos de reatividade vascular *in vitro* em segmentos de aorta e terceiro ramo da artéria mesentérica. Ao final do tratamento, verificamos que não houve alteração da pressão arterial em entre os grupos experimentais. Quanto à reatividade, o tratamento reduziu a resposta contrátil à fenilefrina em anéis de aorta, melhorou o relaxamento induzido pela acetilcolina e não afetou o relaxamento ao nitroprussiato de sódio. No entanto, não observou-se diferença entre os parâmetros analisados em artérias mesentéricas. A remoção do endotélio e a pré-incubação com L-NAME (100 μ M), deslocaram a curva concentração-resposta à fenilefrina para a esquerda, no entanto, essa resposta foi de maior magnitude em aorta de ratas sham quando comparada à ovx. O tratamento com bloqueador de MR igualou a curva concentração-resposta à fenilefrina em aorta isolada de ratas ovx com aquelas obtidas de ratas sham, sugerindo uma melhora da biodisponibilidade de NO em ratas com deficiência estrogênica. Em artérias mesentérica, não foi encontrada diferença nas curvas concentração-resposta à fenilefrina, entre os grupos experimentais. A incubação com tiron (1 mM), promoveu redução da resposta à fenilefrina que foi maior em aorta de

ratas ovx, sugerindo maior liberação de espécies reativas de oxigênio. A incubação com apocinina (30 μM) e catalase (1000 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), reduziu a resposta constritora à fenilefrina somente em aorta isolada de ratas ovx. O tratamento com bloqueador de MR não modificou as curva concentração-resposta à fenilefrina na presença de tiron, apocinina e catalase, em aorta isolada de ratas ovx, sugerindo uma redução do estresse oxidativo em ratas com deficiência estrogênica. Em anéis de mesentéricas o tiron, apocinina e a catalase não alteraram a reatividade vascular em nenhum dos grupos. A indometacina (10 μM) promoveu redução da resposta contrátil à fenilefrina em aorta de ambos os grupos. No entanto, a magnitude deste efeito foi maior em aorta isolada de ratas ovx, sugerindo maior liberação de prostanóides constritores. O tratamento com bloqueador de MR, no entanto, aboliu esses efeitos. Na mesentérica a resposta máxima à fenilefrina foi reduzida no grupo sham após incubação com indometacina, o qual foi restaurada após tratamento com espironolactona. Por outro lado, o grupo ovx, não houve nenhuma alteração na resposta contrátil. O tratamento com espironolactona reduziu, em aorta, a produção basal de ânion superóxido, promoveu redução da expressão proteica vascular da gp91^{phox}, NOX4 e SOD, além de redução dos níveis plasmáticos de malondialdeído em ratas sham e ovx. Em conclusão, os nossos resultados sugerem que a redução dos níveis de estrogênio com consequentemente aumento de ROS e redução da biodisponibilidade de NO em aorta, atuam em conjunto para produzir as alterações vasculares, os quais são revertidos após tratamento com bloqueador de MR.

Palavras-chave: Ovariectomia, Estresse oxidativo, Reatividade vascular, Aorta, Mesentérica, Espironolactona.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are one of the major causes of morbidity and mortality in postmenopausal women who lack the cardioprotective role of estrogen. Estrogen deficiency is related to endothelial dysfunction and increased oxidative stress. At the same time, studies show that the blockade of MR receptors reduces the oxidative stress present in some cardiovascular diseases, in an animal model. Thus the objective of this study was to evaluate the effect of MR receptor blockade on the vascular function of conductance and resistance arteries isolated from ovariectomized rats, focusing on NO bioavailability and oxidative stress. Thus, the animals were separated into 4 experimental groups: Sham and Ovx, treated with vehicle carboxymethylcellulose (0.5% administered 0.3 ml via gavage); Sham Spiro and Ovx Spiro, treated with spironolactone (80 mg / kg dissolved in carboxymethylcellulose, via gavage). All treatment protocols were maintained for 8 weeks. Blood pressure measurements were performed in anesthetized animals and vascular function was investigated through in vitro vascular reactivity studies in segments of the aorta and third branch of the mesenteric artery. At the end of the treatment, we verified that there was no alteration of the blood pressure in ovx rats when compared to the sham group, and the treatment with spironolactone did not modify this parameter. As for reactivity, the treatment reduced the contractile response to phenylephrine in aortic rings, improved acetylcholine-induced relaxation and did not affect relaxation to sodium nitroprusside. However, in mesenteric arteries none of these parameters were altered when compared to ovx and sham rats, both in the absence or presence of spironolactone treatment. Removal of the endothelium and preincubation with L-NAME (100 μ M) shifted the concentration-response curve to phenylephrine to the left, however, this response was of greater magnitude in the aorta of sham rats when compared to ovx. MR blocker treatment equaled the concentration-response curve to aorta phenylephrine isolated from ovx rats with those obtained from sham rats, suggesting an improvement in NO bioavailability in estrogen deficient rats. In mesenteric arteries, no difference was found in the concentration-response curves to phenylephrine, between ovx and sham rats, in the presence or absence of MR blocker. Incubation with thiram (1 mM) promoted reduction of

the response to phenylephrine that was higher in the aorta of ovx rats, suggesting greater release of reactive oxygen species. Incubation with apocynin (30 μ M) and catalase (1000 U \cdot mL⁻¹) reduced the concomitant response to phenylephrine only in the aorta isolated from ovx rats. Treatment with MR blocker did not modify the concentration-response curve to phenylephrine in the presence of thyroxine, apocynin and catalase in aorta isolated from ovine rats, suggesting a reduction of oxidative stress in estrogen deficient rats. In mesenteric rings, tiron, apocynin and catalase did not alter vascular reactivity in either group. Indomethacin (10 μ M) significantly reduced the contractile response to phenylephrine in the aorta of both groups. However, the magnitude of this effect was higher in the isolated aorta of ovx rats suggesting greater release of constrictor prostanoids. Treatment with MR blocker, however, abolished these effects. In mesenteric the maximal response to phenylephrine was reduced in the sham group after incubation with indomethacin, which was restored after treatment with spironolactone. As for the ovx group, there was no change in the contractile response. Treatment with spironolactone reduced the basal production of superoxide anion in the aorta and promoted reduction of vascular protein expression of gp91phox, NOX4 and SOD, as well as reduction of plasma levels of malondialdehyde in sham and ovx rats. In conclusion, our results suggest that the reduction of estrogen levels with consequent increase of ROS and reduction of the bioavailability of NO in the aorta act together to produce the vascular alterations, which are reversed after treatment with MR blocker.

Key words: Ovariectomy, Oxidative stress, Vascular reactivity, Aorta, Mesenteric, Spironolactone.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ENDOTÉLIO VASCULAR

O endotélio vascular possui uma única camada celular que reveste a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos, constitui uma interface ativa, situada entre a circulação e o restante da parede vascular. O endotélio controla a permeabilidade vascular, regulando o tráfego de moléculas nas células. (RUBANYI, 1993)

Desde 1980, o endotélio deixou de ser apenas uma barreira entre o sangue e a parede vascular (FURCHGOTT AND ZAWADZKI, 1980) passando a ser considerado um órgão endócrino, com capacidade de modular a motricidade vascular, a coagulação sanguínea, o crescimento e a proliferação vascular. (RUBANYI, 1993)

O endotélio serve tanto como uma barreira semi-permeável, quanto função de ser um regulador do tônus vascular, por liberar e sintetizar várias substâncias vasoativas: vasodilatadores (óxido nítrico, prostaciclina, fatores hiperpolarizantes derivado do endotélio), vasoconstritores (endotelina, angiotensina II, tromboxano A2, prostaglandinas, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radicais livres) (MONCADA et al., 1994; FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980; PALMER et al., 1987; FELETOU & VONHOUTTE, 1988; RUBANYI & VANHOUTTE, 1986; KIFOR & DZAU 1987; YANAGISWA et al., 1988; FROLICH & FORSTERMANN, 1989; VANHOUTTE, 1993). (Figura 1)

Dentre as substâncias vasodilatadoras, o óxido Nítrico (NO), maior regulador do tônus vascular, é sintetizado principalmente pela Óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) no sistema vascular (MALINSKI et al., 1993; HAKIM et al., 1996; FELS et al., 2010). Após sua síntese no endotélio, o NO difunde-se para o músculo liso vascular, ativa a enzima guanilato ciclase (GC) que medeia a formação do 3,5 – monofosfato cíclico de guanosina (cGMP). O GMPc ativa a proteína cinase G (PKG) que fosforila diversas proteínas, reduzindo a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, que por fim, induz o

relaxamento vascular. (FÖRSTERMANN AND MÜNDEL, 2006; FELS *et al.*, 2010).

A PKG ativa canais para K^+ dependentes de Ca^{+2} , inibindo assim a entrada de Ca^{+2} do conteúdo extracelular pelos canais de cálcio dependentes de voltagem, hiperpolarizando a membrana. Esses mecanismos contribuem para a diminuição da Ca^{+2} intracelular, e consequentemente o relaxamento do músculo liso vascular (MONCADA *et al.*, 1991., CANNON III., 1998; LINCOLN *et al.*, 2001; TRIGGLE *et al.*, 2003).

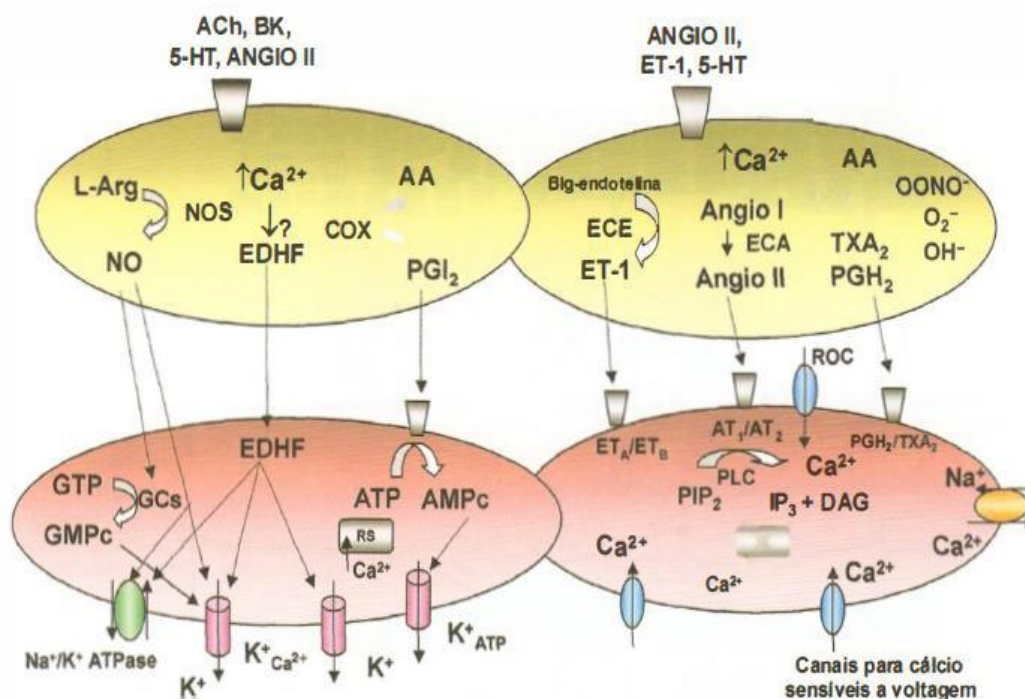


Figura 1: Fatores vasodilatadores e vasoconstritores derivados do endotélio e sua ação no músculo liso vascular. Fatores vasodilatadores: óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Fatores vasoconstritores: endotelina I (ET-I), angiotensina II (Angio II), tromboxano A₂ e prostaglandina H₂ (TXA₂ e PGH₂). Espécies reativas do oxigênio: ânion superóxido (O₂⁻), peróxido nítrico (OONO⁻) e radical hidroxila (OH⁻). L-ARG: L-arginina; COX: ciclooxigenase; ECA: enzima conversora de angiotensina; ROC: canais para cálcio operados por receptor; RS: retículo sarcoplasmático; PIP₂: fosfatidilinositol bifosfato; PLC: fosfolipase C; IP₃: inositol trifosfato; DAG: diacilglicerol. (Adaptado Margarida, 2005).

A produção e a função diminuídas do óxido nítrico derivado do endotélio e de outros fatores vasoprotetores e/ ou a produção exagerada de proinflamatórios e vasoconstritores levam eventualmente a disfunção endotelial (WONG, 2010).

1.2 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

A disfunção endotelial é considerada um marcador de doença vascular e desempenha um papel importante no início e progressão de eventos clínicos. (BONETTI *et al*, 2003; WIDLANSKY *et al*, 2003; JABLONSKI *et al*, 2013; DICKINSON *et al*, 2009; SEALS *et al*, 2011).

A disfunção endotelial envolve vários mecanismos, dentre os quais destacam-se: 1) diminuição da liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio: NO, EDHF e/ou prostaciclina; 2) diminuição da biodisponibilidade desses fatores, principalmente NO, por inativação oxidativa; 3) disfunção nas vias de transdução dos sinais dos fatores de relaxamento endoteliais; 4) diminuição da sensibilidade da musculatura lisa vascular aos fatores de relaxamento; 5) aumento da produção de fatores de contração produzidos pelo endotélio: endotelina-1, PGH₂, tromboxano A₂, e/ ou ânions superóxido (BATLOUNI, 2001).

1.2.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO's)

O estresse oxidativo é a condição que envolve um aumento na produção das espécies reativas de oxigênio, na qual há uma incapacidade das enzimas antioxidantes de controlarem essa produção, levando também desequilíbrio na biodisponibilidade do sistema enzimático (PARAVICINI, 2008).

As ERO's são geradas durante o metabolismo de oxigênio e são altamente reativas podendo tanto retirar elétrons, doar elétrons ou reagir com outras moléculas (SZASZ *et al.*, 2007). Compreende dois grupos moleculares: 1) radicais livres tais como ânion superóxido (O₂⁻), hidroxila (OH), e óxido nítrico (NO) e 2) sem radicais de oxigênio atômico (O₂), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ácido hipocloroso (HOCl), peróxido nitrito (ONOO⁻) e hidroperóxidos

lipídicos (LOOH); que são mais estáveis e têm maior meia-vida do que radicais livres.

No estresse oxidativo, quantidades significativas de ânion superóxido O_2^- podem reagir com o NO formando peroxinitrito ($ONOO^-$) (RUBANY,1986), que atua como radical livre. Em consequência, diminui a biodisponibilidade de NO endotelial e seu efeito vasodilatador, além de manifestar um efeito vasoconstritor e deletérios do O_2^- e $ONOO^-$ (AUCH-SCHWELK *et al.*,1989).

Uma das maiores fontes de geração de EROs, especialmente O_2^- nos vasos sanguíneos é a enzima NADPHoxidase que está presente em vasos sanguíneos. As células endoteliais expressam as subunidades NOX-2, NOX-4 e NOX-5, as células musculares lisas expressam NOX-1, NOX-4 e NOX-5 e macrófagos e monócitos fundamentalmente NOX-2. Atualmente considera-se que NOX-1 e NOX-2 podem ser as principais subunidades que contribuem para o estresse oxidativo vascular nas enfermidades cardiovasculares (DRUMMOND *et al.*, 2011) (Figura 2)

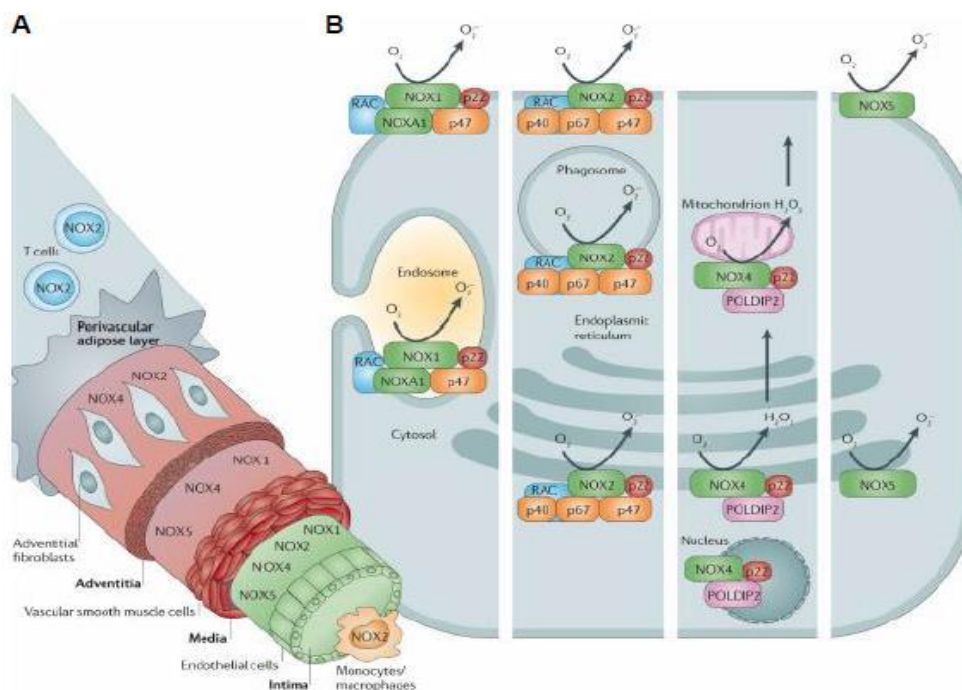


Figura 2 – Representação esquemática das isoformas da NADPH oxidase na parede do vaso sanguíneo. A) A localização celular (células endoteliais, célula do músculo liso vascular, fibroblastos, macrófagos e células T) Isoformas da NADPH oxidase (NOX-1, NOX-2, NOX-4 e NOX-5) através da seção transversal de uma artéria; B) Diagrama esquemático de uma célula

hipotética na qual todas as isoformas da NADPH oxidase (começando com NOX-1 na coluna à esquerda e finalizando com NOX-5 na coluna à direita e suas possíveis localizações intracelulares) (DRUMMOND *et al.*, 2011).

O adequado equilíbrio entre a geração e a inativação das EROs é necessário porque esses radicais modulam a função vascular. Na presença de desequilíbrio, com prevalência de formação de EROs, pode ocorrer ativação de vias de sinalização intracelulares que provocam a proliferação celular descontrolada, remodelamento vascular, processo inflamatório e alteração no tônus vascular (SZASZ *et al.*, 2007).

1.2.2 PROSTANÓIDES

Os principais prostanóides são: Prostaglandina E2 (PGE2), Prostaciclina (PGI2), Prostaglandina D2 (PGD2), Prostaglandina F2 α (PGF2 α), e Tromboxano A2. Eles são produzidos por praticamente todos os tecidos, podem atuar de maneira parácrina ou autócrina para manter a homeostase corporal. Durante uma inflamação, tanto o nível, como o perfil de prostanóides secretados alteram significativamente (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011).

A produção dos prostanóides depende da atividade de enzimas denominadas prostaglandinas G/H sintases, ou simplesmente, ciclooxigenases (COX) que exibem atividade bifuncional de ciclooxigenase, e de peroxidase (DAVIDGE ST, 2001).

Existem duas principais isoformas da COX, a COX-1, e a COX-2. A COX-1, é considerada a isoforma constitutiva, é expressa em muitos tecidos, sintetiza pequenas quantidades de PGs, e tem como principal função a manutenção das funções fisiológicas; já COX-2 é conhecida por ser induzida em algumas células por estímulos inflamatórios, hormônios e fatores de crescimento, é uma fonte de prostanóides durante inflamação, e em doenças proliferativas, como o câncer (SMITH *et al.*, 1996).

Ambas as enzimas podem contribuir em processos homeostáticos, e em processos inflamatórios (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011). Quando secretados pelas células que os sintetizam, os prostanóides exercem seus efeitos via receptores específicos: TP para o TXA_2 ; IP para a PGI_2 ; FP para o PGF_2 ; DP1 ou DP2 para a PGD_2 e para a PGE_2 são descritos 4 subtipos de receptores denominados EP1 – EP4 (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011; FUNK, 2001; WRIGHT et al., 2001)

Os receptores EP apresentam mecanismos distintos, relacionando-se de acordo com a subunidade na qual o mesmo se encontra ligado à proteína G. Sendo que, o grupo de receptores acoplados à proteína Gs (IP, DP, EP4, EP2) promove ativação da adenilato ciclase, aumento do AMPc e consequente relaxamento do músculo liso vascular. Já os receptores EP1, FP e TP encontram-se acoplados à proteína Gq, e quando são estimulados controlam o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e assim promovem vasoconstrição (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011; FUNK, 2001; WRIGHT et al., 2001).

Além dos efeitos descritos acima, um estudo recente demonstrou que produtos derivados da COX-2 podem modular a produção de ERO's, contribuindo para o aumento do estresse oxidativo (MARTÍNEZ-REVELLES et al, 2013). Esses fatores, associados, podem contribuir para a gênese e/ou manutenção de diversas doenças cardiovasculares. Como já é sabido, em mulheres, a incidência de doenças cardiovasculares aumenta na pós-menopausa devido à redução de estrogênio, o qual atua como protetor cardiovascular (FAUSTINO, 2013).

1.3 ESTROGÊNIO

Os estrogênios 17- β -estradiol, estriol, estrona, atuam sobre as células alvo através de receptores (ERs) que pertencem à família de fatores de transcrição nucleares. Nos mamíferos, há dois tipos de receptores de estrogênio: ER α e ER β (GUSTAFSSON, 2003; KATSU et al., 2013; HAWKINS E THOMAS, 2004).

No sistema cardiovasculares, o estrogênio (E2) tem como efeito induzir o relaxamento vascular através do aumento da expressão e atividade da (eNOS) (MACRITCHIE *et al.*, 1997; KLEINERT *et al.*, 1998). O estrogênio, através de seus receptores associados à membrana das células endoteliais estimula agudamente a atividade da eNOS, através do mecanismo clássico dependente de cálcio / calmodulina que envolve fosfatidilinositol 3-quinase / fosforilação mediada por AKT na Ser1177 (HAYNES *et al.*, 2000; FLORIAN *et al.*, 2004). (Figura 3).

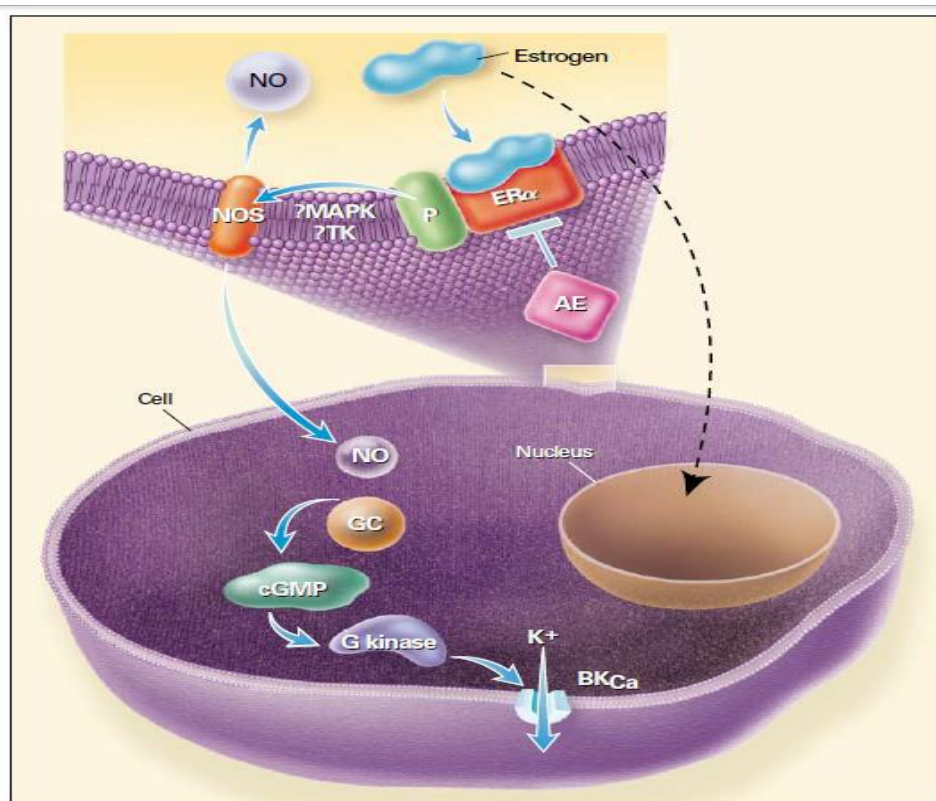


Figure 3- Mecanismo de ativação do Óxido Nítrico sintase pelo estrogênio em células endoteliais e células musculares lisas. O estrogênio provoca a ativação rápida de óxido nítrico sintase (NOS) de uma forma que não requer transcrição de novos genes. Nas células endoteliais (porção superior da figura), isto provavelmente ocorre por uma ação nova do receptor de estrogênio a (ERα), o resultado é a rápida ativação da NOS endotelial (MENDELSON, KARAS, 2016)

Esta ação local aguda sobre a atividade da eNOS tem um efeito imediato sobre o tônus vascular (CHAMBLISS E SAUL, 2002; HAYNES *et al.*, 2003). Além disso, o E2 estimula o aumento da biodisponibilidade do NO, pela diminuição na produção de derivados do endotélio como ânion superóxido (GUETTA *et al.*,

1997, WASSMANN *et al.*, 2002), por reduzir a NAD(P)H-oxidase nas células endoteliais (WAGNER *et al.*, 2001).

O estrogênio possui outra função importante no sistema cardiovascular, conhecida por regular do sistema renina angiotensina, incluindo componentes deste sistema, como a Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e receptor AT1 (SUMINO *et al.*, 2003; GALLAGHER *et al.*, 1999; SHENOY *et al.*, 2009; FRESHOUR *et al.*, 2001).

Esse hormônio parece não agir diretamente na ECA, mas é sugerido que ele reduz sua atividade por regular a síntese de mRNA desta enzima em nível tecidual (GALLAGHER *et al.*, 1999).

A deficiência de estrogênio leva à regulação positiva de AT1 e sua afinidade aumentada para angio II (NICKENIG *et al.*, 1998). A angio II tem um papel importante na regulação cardiovascular, pois a mesma aumenta a atividade NADPH oxidase e sua expressão que está associada com uma proteína menor chamada p22^{phox} (AKKI *et al.*, 2009)

O receptor AT1, acoplado a proteína G, além disso, a outra proteína no qual ele está acoplado é a proteína Gq, no qual, quando estimulada, o efeito imediato é ativar a fosfolipase C e assim ocorre a abertura de canais de cálcio (MEHTA, GRIENDLING *et al.*, 2007). Essa modulação via proteínas G diminui os níveis celulares de AMP cíclico, estimula as fosfolipases C, A₂ e D, aumenta a geração de inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) e diaclicerol, aumentando a concentração de cálcio intracelular e estimulando a atividade da proteína quinase C (LEVENS *et al.*, 1992).

Atualmente, estudos mostram que o estrogênio também pode promover um *up regulation* em receptores AT2 sistematicamente e na vasculatura renal (ARMANDO *et al.*, 2002). Esta ação é bastante relevante para proteção contra as doenças cardiovascular em mulheres pré-menopausa (PEPINE *et al.*, 2006; GRODSTEIN *et al.*, 2000)

A ativação do receptor AT₂ medeia efeitos benéficos no sistema cardiovascular incluindo vasodilatação, antiproliferação e apoptose (DÜSING, 2016).

Diante das funções que o estrogênio exerce sobre o sistema cardiovascular, várias pesquisas apontam que a deficiência hormonal está associada à redução da vasodilatação, devido a uma disfunção endotelial que resulta em um aumento na incidência de doenças cardiovasculares em mulheres na pós-menopausa (HAMMES & LEVIN, 2007).

1.4 DEFICIÊNCIA DE ESTROGÊNIO

A menopausa é um período caracterizado pela perda gradual da função ovariana e da capacidade reprodutiva, chamado de hipoestrogenismo (BECHLIOULIS *et al.*, 2012). Entretanto, algumas mulheres podem apresentar esta etapa de transição de forma precoce, promovendo disfunção ovariana em um período em que deveria estar em sua fase reprodutiva (BECHLIOULIS *et al.*, 2012).

A menopausa precoce pode ser espontânea, caracterizada pela redução do número de folículos ovulatórios (CRAMER *et al.*, 1995; HARLOW & SIGMORELLO, 2000), ou pode ser de forma induzida devido a intervenções médicas, tais como, quimioterapia ou intervenções cirúrgicas como ooforectomia bilateral (SHUSTER *et al.*, 2010).

A perda da função ovariana pode ser um fator de risco específico para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (STEVENSON, 2000). Essas doenças incluem insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral e hipertensão (THOM, 1989).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) se caracteriza por ser uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). A HAS está associada a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo como o coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos, com

consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais (MANCIA *et al.*, 2007; THIRD REPORT OF THE NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM, 2002).

A hipertensão tem alta prevalência e baixas taxas de controle, é considerada um dos principais fatores de risco (FR) modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública.(VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL,2010). No Brasil, HA atinge 32,5% (36 milhões) de adultos, mais de 60% dos idosos, contribuindo para 50% das mortes por doença cardiovascular (DCV) (THOMOPOULOS, PARATI *et al.*, 2014).

Quando comparado homens e mulheres em idade fértil a prevalência de hipertensão não é semelhante, níveis mais elevados são encontrados em homens até 50 anos de idade quando comparado às mulheres, porém esse quadro é revertido a partir da 5ª década de vida (RECKELHOFF & FORTEPIANI, 2004).

Assim, fica evidenciado que as doenças cardiovasculares em mulheres na pós menopausa estão associada a falta do estrogênio, mostrando que esse hormônio é um regulador do sistema renina angiotensina (SRA).

O SRA merece destaque por possuir componentes vasoativos, amplo espectro de atuação, além de seu papel crítico na regulação da PA e na homeostase de sódio controlado pela aldosterona (UNGER, 2002)

1.5 ALDOSTERONA

A aldosterona, integra o sistema renina-angiotensina-aldosterona, é um hormônio esteroide da família mineralocorticóide, envolvido no equilíbrio de eletrólitos e controle da pressão arterial. Ações da aldosterona são mediadas principalmente através de receptores mineralocorticóides (MR), que ativam mecanismos genômicos bem caracterizados. (HOLLENBERG *et al.*, 2004;. TOUYZ, *et al.*, 2004; CALLERA *et al.*, 2011;. BRIONES *et al.*, 2012;. BRUDER-NASCIMENTO *et al.*, 2014).

Esses efeitos genômicos são caracterizados pela ligação do hormônio ao receptor mineralcorticóide. A aldosterona circulante no sangue liga-se a proteínas plasmáticas e vai para o citoplasma, local onde a aldosterona liga-se ao receptor MR. Esse complexo penetra no núcleo celular e se liga a elementos específicos para a resposta hormonal atuando como um fator de transcrição e modulando a expressão de várias proteínas envolvidas no transporte de sódio. (LEITE *et al.*, 2008).

Além de retenção de sódio, a aldosterona também reduz a sensibilidade dos barorreceptores, promove a fibrose do miocárdio, proliferação de fibroblastos, e alterações na expressão do canal de sódio (ROCCOE FANG, 2006). Sua ação crônica leva à hipertrofia miocárdica, necrose de miócitos, fibrose e, consequentemente remodelamento cardíaco (WEBER, 2001).

In vitro, a exposição prolongada a aldosterona diminui a concentração de nitrito, e as concentrações de GMPc celulares, e atenua a capacidade de artérias mesentéricas de ratas a contrair (VIRDIS *et al.*, 2002;. NAGATA *et al.*, 2006;. OBERLEITHNER *et al.*, 2009). Portanto, a aldosterona tem ações importantes no sistema cardiovascular, que influenciam a reatividade vascular e a remodelação, a função endotelial e inflamatória (HOLLENBERG *et al.*, 2004;. TOUYZ *et al.*, 2004; CALLERA *et al.*, 2011;. BRIONES *et al.*, 2012;. BRUDER-NASCIMENTO *et al.*, 2014).

O mecanismo pelo qual os MR são envolvidos na função vascular tem sido estudada, e com isso seus mecanismos estão começando a ser elucidados nesses últimos anos. (MCCURLEY A, JAFFE IZ, 2012). A aldosterona circula no plasma podendo exercer seu efeito sobre vasos sanguíneos por ativação de seus receptores no endotélio e nas células do músculo liso (VSMCs) (KORNEL, 1994) ou por efeitos independentes de seus receptores (CHRIST *et al.*, 1995).

Assim os efeitos vasculares da aldosterona se tornam complexos podendo levar tanto respostas vasodilatadoras através do NO pelo endotélio e

vasoconstrição através do aumento cálcio no músculo liso (NGUYEN, JAISSE, 2012; UHRENHOLT *et al*, 2003; TODA *et al.*, 2013) (Figura 4)

Os mecanismos pelos quais a aldosterona leva a diminuição do relaxamento vascular depende do aumento da formação das ERO's, fatores constritores endoteliais, ativação do canal de cálcio, e / ou ativação da liberação de histamina de mastócitos.(SCHJERNING *et al.* 2013; MARON *et al.*, 2012). Ela aumenta a produção de ERO's através da ativação das isoformas da NADPH oxidase (NOX) (CALLERA *et al.*,2005; ZHANG *et al.*, 2014).

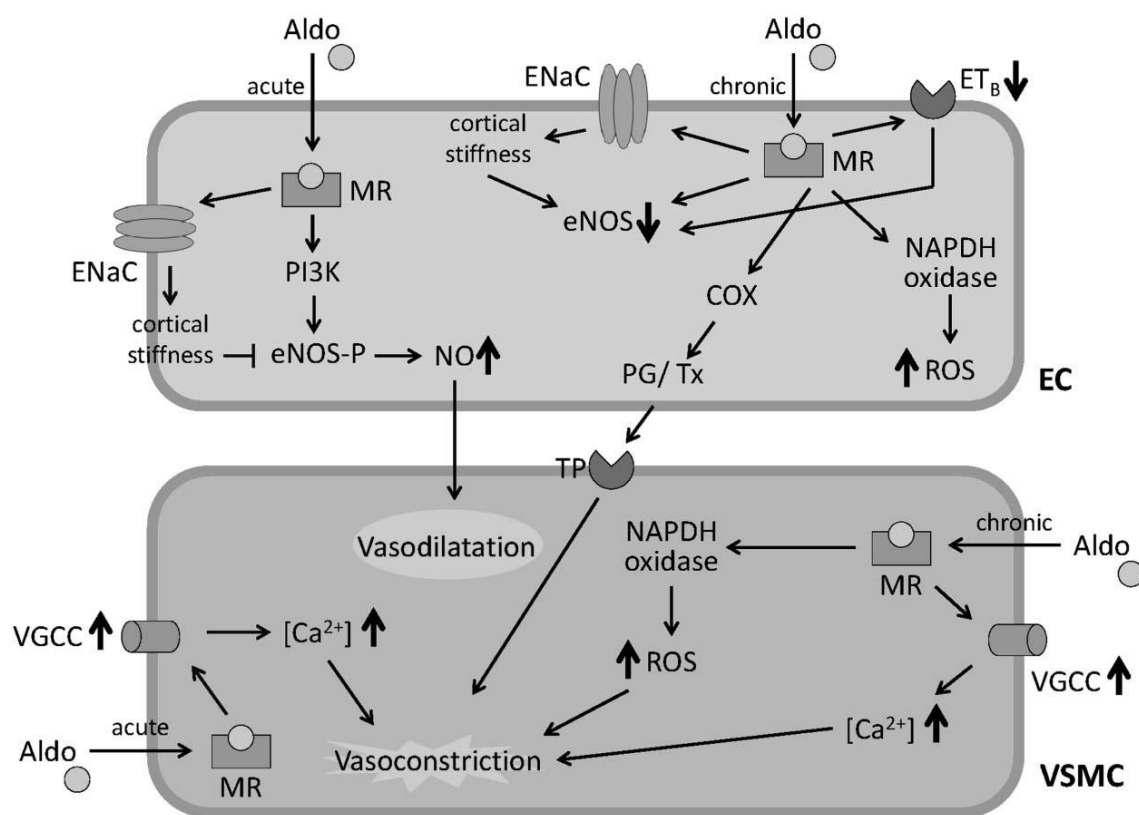


Figura 4: Efeito vascular da aldosterona. Aldosterona ativa MRs no endotélio e célula muscular lisa. A sua resposta depende da exposição aguda ou crônica da aldosterona. Adaptado LYNGSO,2016

Considerando que o aumento de aldosterona eleva o estresse oxidativo vascular, através de mecanismos já mencionados, a terapia com antagonistas de MR reduz ou anula tal efeito (CALLERA *et al.*,2005; ZHANG *et al.*, 2014), sugerindo que a formação de ERO's pode ser induzida pela aldosterona.

Os antagonistas dos receptores MR têm sido utilizados como drogas anti-hipertensivas na hipertensão essencial (LEVY, 2004). Porém antagonista de receptores mineralcorticóide como a espironolactona tem um efeito modesto sobre a pressão arterial como monoterapia, sendo utilizada em adição com outra droga em hipertensão resistente (CHAPMAN, 2007)

Em contrapartida estudo de Martín-Fernández e colaboradores em 2012 mostraram que o tratamento apenas com a espironolactona é capaz de reduzir inflamação e oxidação produzidos pelo isoproterenol, apoiando o papel principal dos mineralocorticoides em alterações cardíacas produzidas por estimulação dos receptores β -adrenérgicos.

Outro grupo de pesquisadores mostraram que a espironolactona é capaz de reduzir a deposição de colágeno após oclusão coronariana (MILL *et al.*, 2003) e de diminuir a rigidez do ventrículo esquerdo em grupo experimental de ratos hipertensos adultos submetidos à dieta hiperssódica (BALDO *et al.*, 2011).

Portanto, o bloqueio MR reduz a inflamação cardíaca, estresse oxidativo, fibrose, remodelação, hipertrofia e melhora a função cardíaca e vascular (VIRDIS *et al.*, 2002; CALLERA *et al.*, 2005, CALLERA *et al.* 2011; BROWN, 2013; VELMURUGAN *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014). Por conseguinte, o tratamento com espironolactona tem mostrado importante papel na melhora da disfunção endotelial e aumento na biodisponibilidade de NO em pacientes com insuficiência cardíaca (FARQUHARSON E STRUTHERS, 2000).

Além disso, estudos mostram que inibidor de receptor mineralcorticóide aumenta a produção de NO, bem como a atividade de enzimas antioxidantes, como a MnSOD e CuZnSOD, nos macrófagos de pacientes com insuficiência cardíaca (LABUZEK *et al.*, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

As doenças cardiovasculares são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em mulheres na pós-menopausa que possuem ausência do papel cardioprotetor do estrogênio.

Na população em envelhecimento e em mulheres pós menopausadas que se encontram em estado de deficiência de estrogênio natural, a prevalência da hipertensão é aumentada. (DUBEY *et al.*2005).

Embora o estrogênio traga benefícios vasculares, ensaios clínicos trouxeram evidências de que a terapia de reposição hormonal (TRH) na pós-menopausa pode aumentar o risco de tromboembolismo e doenças cardiovasculares. (HULLEY *et al.*, 1998; HULLEY *et al.*, 2002). Portanto considerando que a deficiência estrogênica está relacionada com a disfunção endotelial e ao aumento do estresse oxidativo (YUNG, 2011), o bloqueio de receptores de MR nesta condição, poderia trazer benefícios cardiovasculares.

De fato, há trabalhos que demonstram que o bloqueio de receptores de MR reduzem o estresse oxidativo e melhoram a função vascular em doenças cardiovasculares, sabidamente conhecidas por apresentarem aumento do estresse oxidativo (CALLERA *et al.*,2005; ZHANG *et al.*, 2014).A hipótese do nosso estudo é que o bloqueio de receptores mineralcorticóides em vaso de condutância e resistência, pode melhorar a disfunção endotelial em ratas ovariectomizadas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar o efeito do bloqueio de receptores MR sobre a função vascular de artérias de condutância e resistência de ratas ovariectomizadas, com foco na biodisponibilidade de NO e estresse oxidativo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Investigar em artérias de condutância (aorta) e de resistência (segmentos do terceiro ramo da artéria mesentérica) de ratas ovariectomizadas, se o tratamento com espironolactona modifica:
 - a. A reatividade vascular a agentes vasoconstritores e vasodilatadores.
 - b. A liberação de fatores vasodilatadores e vasoconstritores derivados do endotélio. Especificamente, avaliaremos o óxido nítrico, os prostanóides e as espécies reativas de oxigênio.
 - d. A expressão de proteínas envolvidas com a função endotelial, como as isoformas da NADPH (gp91phox, NOX 4 e SOD).
2. Avaliar se a ovariectomia modifica a pressão arterial e possíveis efeitos do tratamento da espironolactona.
3. Investigar se o tratamento com espironolactona diminui a produção de ânion superóxido em anéis de aorta e mesentérica.
4. Avaliar os níveis de malondialdeído plasmático, um marcador de estresse oxidativo.

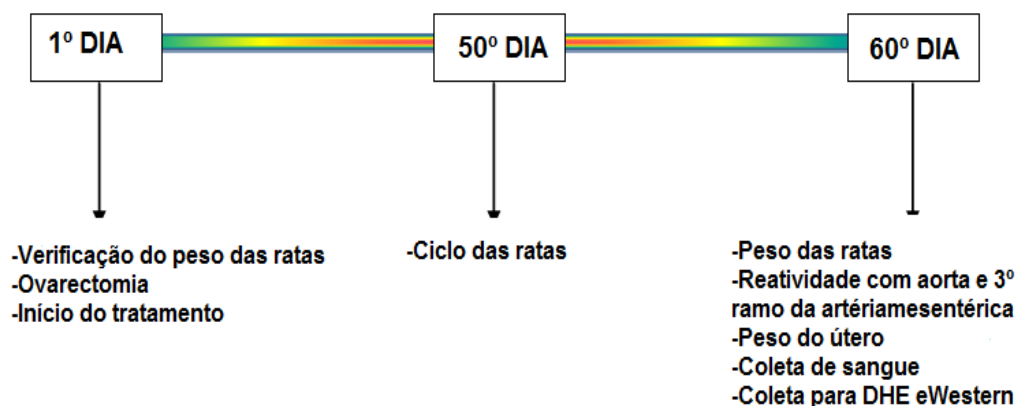
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratas *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*), com peso inicial entre 220-250g e idade de aproximadamente três meses. Os animais foram cedidos do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (43 cm x 30 cm x 15 cm), sob condições controlada de temperatura (22°C), e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e à ração. O uso e o cuidado desses animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, descritos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA, 2015). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES – CEUA #028/2014).

4.2. MODELO EXPERIMENTAL

Os animais foram separados em 4 grupos experimentais, de acordo com o protocolo de tratamento ao qual foram submetidos: Sham e Ovx, tratadas com veículo carboximetilcelulose (0,5% administrado 0,3ml via gavagem); Sham Espiro e Ovx Espiro, tratados com espironolactona (80 mg/Kg dissolvida em carboximetilcelulose, 0,3ml de volume, via gavagem). Esse volume era corrigido de 15/15 dias pela média do peso das ratas. O tratamento teve início no primeiro dia de castração e foram mantidos por 8 semanas. Posteriormente as ratas foram eutanasiadas para coleta de sangue (através da artéria abdominal), vinte e quatro horas após a última dose de tratamento.



4.2.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO (OVARIECTOMIA E SHAM)

Os animais foram anestesiados com Quetamina e Xilasina (100 e 10 mg/kg, intraperitoneal; i.p), o animal foi mantido em decúbito lateral imobilizado com fita adesiva sobre a prancha cirúrgica, antes da incisão foi realizada tricotomia na região dos flanco e assepsia com álcool 70%.

Após esse procedimento, foi feito um pequeno corte subcutâneo (cerca de 1 cm) na região abdominal cujo ponto central era aproximadamente a 1,5 cm abaixo da última costela, no eixo craniocaudal e com distância da coluna vertebral de aproximadamente 1,5 cm., expondo a musculatura abdominal do animal.

A seguir, um pequeno corte foi feito na musculatura abdominal expondo a cavidade abdominal com o intuito de exteriorizar os ovários. O ovário foi localizado e amarrado com fio absorvível (catigut simples) próximo à junção da trompa uterina com o ovário, seguindo com sua remoção. A musculatura foi então suturada com o fio reabsorvível e a pele foi suturada com fio catigut cromado 5-0.

Foi realizado assepsia da região e o procedimento foi repetido no lado oposto. O grupo Sham foi submetido aos mesmos procedimentos cirúrgicos exceto a remoção dos ovários. Ao final do procedimento, os animais receberam uma injeção de antibiótico por 5 dias (Enrofloxacina - 2,5 % - 0,1 mL – i.m)

4.2.2 AVALIAÇÃO DO CICLO ESTRAL PELO ESFREGAÇO VAGINAL

Os animais foram submetidos à avaliação do ciclo estral (10 dias antes da castração e 10 dias antes do sacrifício) com a intenção de avaliar em qual fase do ciclo estavam para a realização dos experimentos.

A secreção vaginal foi coletada com uma pipeta contendo 10 µL de solução salina (NaCl a 0,9%). A ponta da pipeta foi introduzida gentilmente, na cavidade vaginal das ratas, movimentos circulares suaves foram realizados e o conteúdo vaginal foi aplicado a uma lâmina de vidro junto a uma gota de solução de lugol, sendo posteriormente analisado em microscópio de luz (Bel Photonics FLUO-2) sem o uso da lente condensadora, com 10x e 40x lentes objetivas.

De acordo com a determinação do ciclo, após a análise da predominância das células observadas, os animais foram classificados em estro, diestro I, diestro II e proestro (MARCONDES *et al.*, 2002).

A fase do proestro foi confirmada quando havia predomínio de células nucleadas epiteliais; uma predominância de células cornificadas caracterizou a fase do estro; a presença de células epiteliais nucleadas, cornificadas e leucócitos em proporções semelhantes, foi um indicativo da fase do metaestro.

E por fim, quando houve predomínio de leucócitos a fase foi caracterizada como diestro. Uma semana antes da data do procedimento experimental, as ratas tiveram o ciclo estral acompanhado, e o experimento só foi realizado quando as ratas se encontravam no proestro.

4.3 MEDIDA DIRETA DE PARÂMETROS HEMODINÂMICOS

As ratas tiveram seu peso corporal registrado antes (dia 0), durante (15 dias, 30 dias, 45 dias) e no dia do sacrifício. Ao final do tratamento (60 dias após a cirurgia), os animais de ambos os grupos foram anestesiados com uretana 30%

(1,2 g/ Kg, i.p.). O plano anestésico foi avaliado pela responsividade ao estímulo doloroso, e quando necessário, houve suplementação na dose.

A rata então era colocada em uma mesa cirúrgica adequada para ratos, feita com uma superfície plana de madeira. A pele sobre o lado ventral do pescoço, onde foi feita a incisão cirúrgica, foi cuidadosamente limpa e desinfetada com álcool 70 %

A cateterização foi realizada na artéria carótida direita para mensuração dos parâmetros cardiovasculares (pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média e frequência cardíaca). Para esta cateterização foram utilizadas cânulas de polietileno PE-50 (Intramedic Polyethylene Tubing, Clay Adams, Becton, Dickinson and Company, Nova Jérsei, EUA) preenchidas com salina heparinizada (50 U/ml).

A artéria carótida direita foi identificada juntamente com o nervo vago, ao lado direito da traqueia, sendo separada delicadamente do tecido conjuntivo adjacente e do nervo vago, com o cuidado de não estimulá-lo, em seguida a cânula era inserida e amarrada com um fio sem obstruir o fluxo de sangue.

Os cateteres, já introduzidos na carótida direita do animal, eram acoplados a um transdutor de pressão (TSD 104A- Biopac conectado a um pré-amplificador) interligado ao sistema Biopac, o qual permitia que as pressões arteriais e a frequência cardíaca (FC) fossem registradas (MP 30 Byopac Systems, Inc; CA) e processadas por um computador. Para o processamento dos dados foi utilizado taxa de amostragem de 2000 amostras / segundo.

Por fim, após um período de estabilização de 20 minutos foram registrados os parâmetros cardiovasculares, por um intervalo de 15 minutos. Posteriormente as ratas foram eutanasiadas para avaliação da função vascular.

4.4 RETIRADA E PESAGEM DOS ÓRGÃOS

Após coleta do sangue, o útero foi removido. Posteriormente, foi acondicionado na estufa, por 24 horas a 60 °C para análise do peso seco em balança de alta precisão.

4.5 REATIVIDADE VASCULAR

4.5.1 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR – AORTA

Após 8 semanas de tratamento com carboximetilcelulose e espironolactona, a função vascular foi investigada através de estudos de reatividade vascular in vitro em segmentos de aorta em preparação de banho de órgãos com a finalidade de avaliar os efeitos do tratamento com espironolactona sobre a reatividade vascular.

A aorta torácica descendente foi cuidadosamente removida e imersa rapidamente em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-modificado, composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; KH_2PO_4 1,17; NaHCO_3 24; Glicose 11; EDTA 0,01, aerada com mistura carbogênica contendo 5% de CO_2 e 95% de O_2 . Esta solução foi mantida com pH 7,4. Após a retirada do tecido conectivo e adiposo, a aorta torácica foi dividida em segmentos cilíndricos de aproximadamente 3 a 4 mm de comprimento (Figura 5).

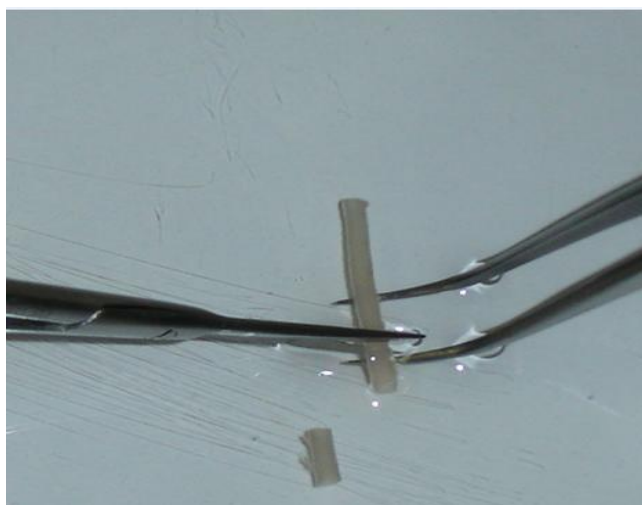


Figura 5: Aorta torácica, de rato Wistar, imersa em solução fria de Krebs-Henseleit, após a remoção do tecido conectivo e adiposo, sendo dividida em segmentos de 4 mm (modificado de Fiorim, 2011).

Cada anel vascular foi colocado em cubas contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecida a $36 \pm 0,5$ °C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o pH estável em 7,4. Dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos de forma que fiquem paralelos na luz do vaso. Um fio foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso era captada pelo transdutor de força (TSD 125) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Bárbara, CA- USA) e este a um computador (Figura 6).

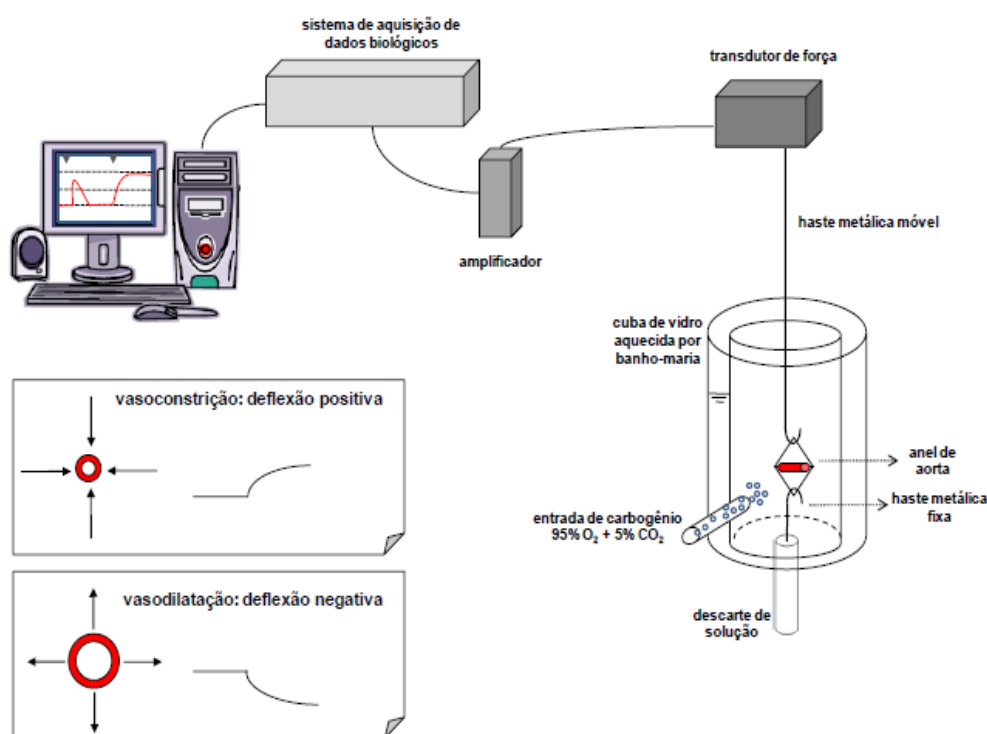


Figura 6: Esquema sobre a preparação experimental dos anéis de aorta em banho de órgãos para a realização de estudos de reatividade vascular *in vitro* (adaptado de Faria, 2014).

Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 0.9 a 1.2 g, reajustada, quando necessário, durante 45 minutos de estabilização.

Após o período de 45 minutos de estabilização, foi administrado ao banho KCl 75 mM para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Após atingirem uma variação de um grama de força a partir do valor basal, estes anéis eram lavados com solução de Krebs-Henseleit até retornar a tensão de repouso. Assim, os anéis que não obtiveram tal contração foram descartados.

Após 30 minutos de estabilização, uma nova dose de KCl (75 mM) era adicionada ao banho para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida após 30 minutos da adição, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração. Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes para atingir o valor basal e, após 30 minutos, esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina (10^{-6} M). Uma vez atingido o platô, uma dose única de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M foi aplicada. Após um período de lavagem, os anéis foram incubados com determinados fármacos.

4.5.1.1 Efeito do tratamento com espironolactona sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

Após a avaliação da integridade funcional do endotélio, a solução nutritiva do banho foi trocada três vezes para que a tensão basal fosse estabelecida. Após 30 minutos de estabilização, era realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) de maneira cumulativa nos dois grupos estudados.

4.5.1.2 Efeito do tratamento com espironolactona sobre a resposta de relaxamento dependente do endotélio

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta com endotélio foram pré-

contraídos com fenilefrina 10^{-6} M. Uma vez obtido o platô, foram realizadas as curvas concentração-resposta, cumulativas à acetilcolina (10^{-11} a 3×10^{-5} M).

4.5.1.3 Efeito do tratamento com espironolactona sobre a modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina

Para avaliar a capacidade do endotélio em modular a resposta constritora à fenilefrina, foram realizados protocolos experimentais com anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e sem endotélio (E-). As células endoteliais foram removidas mecanicamente através do uso de fios metálicos. Estes foram inseridos na luz do vaso e friccionados à sua íntima, ocasionando lesão do endotélio. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina 10^{-5} M de induzir o relaxamento, após a pré-contracção com fenilefrina (10^{-6} M). A preparação foi lavada e, após 30 minutos de retorno à tensão basal, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M).

4.5.1.4 Efeito do tratamento com espironolactona sobre a resposta de relaxamento independente do endotélio

A avaliação da vasodilatação não mediada pelo endotélio foi analisada através do relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS). Assim como para acetilcolina, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina 10^{-6} M e, a seguir, foram realizadas curvas concentração-resposta ao doador de NO, em concentrações de 10^{-11} a 3×10^{-5} M.

4.5.1.5 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos a resposta à fenilefrina na aorta

A curva concentração-resposta à fenilefrina foi realizada na ausência (controle) e presença de: a) um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NG-nitro-L-arginina metil éster, L-NAME, 100 μ M); b) um “varredor” não-enzimático de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), tiron (1 mM); c) um inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase apocinina (30 μ M), d) um “varredor” de peróxido de

hidrogênio, a catalase ($1000 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$); e além disso para avaliar a presença de prostanóides foi utilizado um inibidor não seletivo da COX, Indometacina ($10 \mu\text{M}$). Estes fármacos foram adicionados ao banho 30 minutos antes das curvas de fenilefrina.

4.5.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR - ARTÉRIA MESENTÉRICA

A análise da reatividade das artérias mesentéricas de ratos foi realizada de acordo com método descrito por Mulvany & Halpern (1977). O intestino dos animais era removido para retirar o mesentério. (Figura 7) Este era mantido em solução de Krebs Henseleit (em mM: NaCl 115, NaHCO_3 25, KCl 4,7, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5, KH_2PO_4 1,2, glicose 11,1 e EDTA 0,01) aerada com mistura carbogênica contendo 5% de CO_2 e 95% de O_2 a 4°C e pH 7.4 durante o procedimento de dissecação. O terceiro ramo da artéria mesentérica foi isolado com o auxílio de um microscópio de dissecação e segmentos de aproximadamente 2 mm de longitude foram cortados e mantidos a 4°C .



Figura 7: Fotografia do leito mesentérico mostrando as artérias com suas ramificações.

Após preencher as câmaras do miógrafo para vasos de resistência (Danish Myo Tech, Modelo 410A e 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca) com Krebs Henseleit, dois fios de tungstênio ($40 \mu\text{m}$ de diâmetro) foram inseridos no lúmen das artérias para medida de força isométrica. Um dos fios estava acoplado a um transdutor de força isométrica e o outro fio conectado a um micromanipulador que permitia o estiramento das artérias. Esse miógrafo estava conectado a um sistema para aquisição de dados (Powerlab/800 ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália) e a um computador (PC Pentium).

Após período de 30 minutos de estabilização em solução de Krebs Henseleit gaseificada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂, pH 7,4, 37 °C), as artérias foram estiradas a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. Para isso, em cada segmento arterial a relação tensão: diâmetro interno foi calculada e então foi determinada a circunferência interna correspondente a uma pressão transmural de 100 mmHg para um vaso relaxado in situ (L100). Para a realização dos experimentos, as artérias foram mantidas com uma circunferência interna L1, calculada como $L1 = 0,90 \times L100$, circunferência na qual o desenvolvimento de força é máximo (MULVANY & HALPERN, 1977).

Após estabilização em sua tensão de estiramento ideal, os segmentos de artérias mesentéricas foram expostos a uma solução com concentração alta de potássio (120 mM, a composição é similar ao Krebs Henseleit, no entanto o NaCl foi substituído por KCl em concentração equimolar) para avaliar a capacidade contrátil dos segmentos. A solução foi novamente trocada para solução de Krebs-Henseleit normal e após retorno à sua tensão basal, determinou-se a integridade endotelial.

Para comprovar a integridade endotelial, as artérias foram pré-contraídas com uma concentração de fenilefrina (10^{-6} M) suficiente para produzir 50% da contração produzida pela solução de Krebs-Henseleit com KCl 120 mM, e então o relaxamento vascular foi obtido por exposição a de ACh (10^{-5} M).

4.5.2.1 Efeito do tratamento com espironolactona sobre a resposta de relaxamento dependente do endotélio

O relaxamento dependente do endotélio foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina 10^{-6} M. Uma vez obtido o platô, foram realizadas as curvas concentração-resposta cumulativas à acetilcolina (10^{-11} a 3×10^{-5} M).

4.5.2.2 Efeito do tratamento com espironolactona sobre a resposta de relaxamento independente do endotélio

A avaliação da vasodilatação não mediada pelo endotélio foi analisada através do relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio, através do relaxamento induzido pelo NPS. Assim como para acetilcolina, os anéis foram pré-contraindidos com fenilefrina 10^{-6} M e, a seguir, foram realizadas curvas concentração-resposta ao doador de NO, em concentrações de 10^{-11} a 3×10^{-5} M.

4.5.2.3 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos na resposta à fenilefrina na aorta

A curva concentração-resposta à fenilefrina foi realizada na ausência (controle) e presença de: a) um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NG-nitro-L-arginina metil éster, L-NAME, 100 μ M); b) um “varredor” não-enzimático de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), tiron (1 mM); c) um inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase apocinina (30 μ M), um “varredor” de peróxido de hidrogênio, d) a catalase (1000 U·mL⁻¹); e além disso para avaliar a presença de prostanóides foi utilizado um inibidor não seletivo da COX Indometacina (10 μ M). Estes fármacos foram adicionados ao banho 30 minutos antes das curvas de fenilefrina.

4.6 FLUORESCÊNCIA PRODUZIDA PELA OXIDAÇÃO DO DIHIDROETÍDEO (DHE)

Para verificar a influência do tratamento com espironolactona por 8 semanas, sobre a produção de $O_2^{\cdot-}$ nas artérias mesentérica e aorta, foi utilizada a técnica de fluorescência produzida pela oxidação do DHE. O DHE é um derivado do etídio que entra em contato com $O_2^{\cdot-}$, oxida-se e posteriormente se liga ao DNA das células emitindo fluorescência vermelha. Este método permite analisar a produção *in situ* nos segmentos arteriais.

Os segmentos de aorta e mesentérica foram retirados dos animais, em seguida, limpos e mantidos por 1 hora em solução Krebs-Henseleit com sacarose 30%. Posteriormente, estes segmentos foram congelados em meio adequado (meio de congelamento). Assim, as amostras foram mantidas a -80° C até o dia do experimento.

Ambos os segmentos foram cortados no criostato em anéis com 10 µm de espessura. Posteriormente estes anéis foram adicionados em lâminas gelatinadas e secos em estufa a 37° C durante 30 minutos. Após este procedimento, as lâminas contendo os cortes foram lavadas e posteriormente incubadas com Krebs HEPES (Para 100 ml de Krebs: 29,4 mg de CaCl₂, 759 mg de NaCl, 41,7 mg de KCl, 4,9 mg de MgCl₂, 197,8 mg de HEPES e 198,2 de glicose) por 30 minutos em uma câmara úmida à 37° C. Decorridos os 30 minutos, o Krebs foi escorrido e o excesso seco. Em seguida, foi realizada incubação com DHE 2 µM por duas horas na estufa com câmara fechada a 37° C. A luminescência emitida foi visualizada com microscópio fluorescência invertido (Leica DM 2500) e câmara fotográfica (Leica DFC 310 FX) com filtro 568 nm. As imagens foram quantificadas pelo software ImageJ.

4.7 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE WESTERN BLOT

A técnica de Western Blot foi utilizada para determinar a influência do tratamento com espironolactona sobre a expressão proteica da isoforma da NADPH oxidase a gp91phox, NOX4 e a SOD. Para isto, foram usadas amostras de artéria aorta torácica e artérias mesentéricas.

As amostras foram armazenadas no freezer -80 ° C até a homogeneização, que foi em 150 µL tampão de extração [Tris-HCL pH 7,4 (10 mM), PMSF (1 mM), NaVO₃ (1 mM), SDS (1%), DTT (0,5 mM), EDTA (5 mM) e coquetel de inibidor de protease Diluição 1: 100]. Depois de homogeneizadas as amostras foram centrifugadas (Eppendorf-Neitheier- Hinz GmbH 22331, Alemanha) durante 10 minutos, 6.000 rpm a 4° C e, em seguida, o sobrenadante foi retirado e feita então a quantificação protéica (Fotômetro Bioquímica, Bio 2000, Brasil) pelo método de Bradford (Bradford, 1976). O ensaio de Bradford foi

realizado em placa de ELISA, consistindo num volume final de 200 μ L para cada poço da placa. A solução padrão foi obtida a partir de diluições de albumina bovina (BSA) em água destilada com concentração estoque final de 1mg/mL. Essa solução foi diluída para a obtenção da curva padrão com as seguintes concentrações de BSA: 0,10 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,75 mg/mL; 1,0 mg/mL; além do branco (somente água destilada).

Em seguida foram aliquotados os volumes para uma carga de 50 μ g de proteína, sendo este volume de amostra misturado, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Aliquotas do homogeneizado foram diluídas em solução de Laemmli (Uréia 0,5 mM; SDS 0,17 mM; DTT 39 μ M; Tris-HCl 0,01 M pH=8 e Azul de bromofenol 0,5 %) e após centrifugação foram mantidas à temperatura de 95 °C durante 4 minutos.

4.7.1 Eletroforese e transferência das amostras

As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 10% para SOD, e NADPH oxidase gp91phox, NOX 4 e SOD previamente imersos em um tampão para eletroforese (25 mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS).

4.7.2 Transferência das proteínas

Depois de separadas, as proteínas das amostras foram transferidas para uma membrana de PVDF utilizando uma cuba molhada (Biorad), por 2:00 hs, 60 volts a 4°C, com tampão de transferência constituído de 25 mM de tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina e 20% (v/v) de metanol.

4.7.3 Incubação dos anticorpos

Após a transferência, as membranas de PVDF foram incubadas por 2:30 h em uma solução constituída de leite em pó desnatado (5%) em tampão TBS-tween 0,1% (20 mM de tris-HCl pH 7,4 e 150 mM de NaCl), à temperatura ambiente sob agitação leve, para evitar ligações inespecíficas com reativos não

imunológicos. Em seguida, as membranas foram incubadas por 4 horas a temperatura ambiente, sob agitação, em TBS-T adicionado mais os seguintes anticorpos primários: SOD(1: 2000, Santa Cruz Biotechnology, California, EUA) e para β -actina (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), gp91phox (1:2000 Santa Cruz Biotechnology) e NOX4 (1:2000 Santa Cruz Biotechnology)

Após este período, as membranas foram lavadas em tampão TBS-tween 0,1%, sob agitação leve em temperatura ambiente e incubadas com o anticorpo secundário (IgG, anti-mouse conjugado para fosfatase alcalina - 1:3000, Abcam Inc. e IgG, anti-Rabbit conjugado para fosfatase alcalina – 1:7000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) por 1:30 h, à temperatura ambiente, sob agitação suave, seguida de lavagem com tampão TBS-tween 0,1%, e posteriormente com tampão TBS.

A detecção da ligação proteína-anticorpo foi realizada utilizando-se o Kit comercial NBT/BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate nitroblue tetrazolium (NBT)/5- bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) – Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As membranas tiveram suas imagens digitalizadas e tratadas utilizando o programa ImageJ (domínio público). Em cada ensaio experimental fez-se a normalização em relação ao controle (β -actina), com vista a diminuir os possíveis erros associados às variações nas concentrações das proteínas. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

4.8 MEDIDA DE PRODUÇÃO DE MALONDIALDEÍDO (MDA) NO PLASMA

As amostras de plasma dos animais foram coletadas com tubo heparinizado (jateada na parede interna do tubo), centrifugadas a 5000 rpm a 4 °C por 15 minutos e armazenadas a -80 °C até o dia da análise.

As concentrações plasmáticas de MDA foram mensuradas por ensaio modificado de ácido tiobarbitúrico (TBA) (WIGGERS et al, 2008). Os radicais livres reagem com os PUFA da membrana celular e lipoproteínas, transformando-os em ácidos graxos peroxidados os quais sofrem redução de

sua cadeia lateral liberando MDA, de maneira que sua concentração sérica é proporcional à quantidade de ácidos graxos poliinsaturados oxidados e, portanto um indicador de peroxidação lipídica.

Após centrifugação do sangue, o plasma foi coletado e misturado ao ácido tricloroacético a 20 % em 0,6 M HCl (1:1 vol/vol) e mantidos em gelo por 20 minutos para precipitar seus componentes e evitar possíveis interferências. As amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 1500 x g antes de adicionar o TBA (120 mM em Tris 260 mM, pH 7) ao sobrenadante numa proporção de 1:5 (v/v). Após, a mistura foi aquecida a 97° C por 30 minutos. A medida foi realizada através da absorbância usando Absorbance Microplate Reader (ELx808TM).

4.9 EXPRESSÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores de n significam o número de animais utilizados em cada grupo experimental. Para análise dos dados e aplicação dos testes estatísticos foi utilizado o programa *GraphPad Prism Software 5.0* (San Diego, Califórnia, EUA).

Foram calculados os valores de resposta máxima (Rmax) e de pD2 (-log EC50) das curvas concentração-resposta à fenilefrina, à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio e nas situações experimentais (remoção do endotélio ou na presença de fármacos) através da análise de regressão não-linear de cada curva individualmente.

Para comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta contrátil à fenilefrina dos grupos estudados, alguns resultados foram expressados através da diferença da área abaixo da curva (dAUC) de concentração-resposta à fenilefrina. A diferença está expressa como porcentagem (%dAUC) da curva controle correspondente.

Para comparar três médias ou mais, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) uma ou duas vias para medidas repetidas ou completamente randomizadas. Quando o teste ANOVA detectava significância estatística, foi realizado o pós-teste (*pos-hoc*) de Bonferroni ou de Tukey.

Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

4.10 FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS

- Acetilcolina, cloridrato (Sigma)
- Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma)
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Merck)
- Ácido hidroxietilpiperazina etanosulfônico (HEPES) (Sigma)
- Ácido tiobarbitúrico (Sigma)
- Ácido tricloroacético (Merck)
- Acrilamida (N, N`-Metilenbisacrilamida 40 % Solução 37, 5:1): BioRad
- Albumina bovina (Sigma)
- Anticorpo produzido em camundongo para β -actina (Sigma)
- - Anticorpo policlonal produzido em coelho para SOD-Mn (Millipore)
- Anticorpo monoclonal produzido em camundongo para gp91phox (Sigma)
- Apocinina (Acetovanilona) (Sigma)
- Bicarbonato de sódio (Vetec)
- Carbogênio (95 % de O₂ e 5 % de CO₂) (White Martins)
- Carboximetilcelulose 0,5%
- Catalase (Sigma)
- Cloreto de cálcio diidratado (Merck)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Dihidroetídeo (Sigma)
- Dodecil-sulfato de sódio (SDS) (Sigma)
- Espironolactona 80mg
- Fosfato de potássio monobásico (Merck)
- Glicerol (Sigma)

- Glicina (Sigma)
- Glicose (Merck)
- Hidróxido de sódio (Sigma)
- Inibidor de protease (Cocktail for General Use) (Sigma)
- Indometacina (Sigma)
- Leite desnatado (Nestlé)
- L-Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- Metanol (Sigma)
- ML171 (Sigma)
- N,N, N',N'- Tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma)
- N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)
- Nitroprussiato de sódio, dihidratado (Fluka)
- OCT tissue-tek (Sakura)
- Persulfato de amônio (APS) (Sigma)
- Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (Sigma)
- Reagente para detecção de Western Blot (ECL Plus) (Amersham)
- Sacarose (Merck)
- SDS (dodecil sulfato sódico) (Sigma-Aldrich)
- Sulfato de magnésio heptahidratado (Merk)
- Tiron (Sigma)
- Tris HCl (Sigma)
- Uretana (Sigma)

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada e mantidas no congelador a -20° C. Exceto Indometacina (preparada em solução TRIS/bicarbonato de sódio) e Espironolactona (dissolvida em Carboximetilcelulose 0,5%)

5. RESULTADOS

5.1 PESO CORPORAL

Os animais foram acompanhados durante o tratamento. Na tabela 1, encontram-se os resultados obtidos no início do tratamento dos grupos Sham, Ovx, Sham Espiro e Ovx Espiro e o peso final dos respectivos animais. Como esperado, os animais ovariectomizados tiveram um aumento significativo no peso corporal em comparação com os animais sham. A espironolactona não alterou estas alterações induzidas pela ovariectomia.

	SHAM	OVX	SHAM ESPIRO	OVX ESPIRO
Peso Corporal	228±2,1	237±2,1	232±2,5	232±2,4
Peso Corporal Final	279±4,3*	335±6,7*#	280±3,5*	337±2,4*

Tabela 1: Comparação do peso corporal (em gramas), N=6 para todos os grupos. Resultados estão expressos como média ± EPM. *P<0,05 versus sham and #P<0.05 versus Ovx. ANOVA 1 via, seguida de pós teste de Tukey para comparações múltiplas.

5.1.2 PESO DO ÚTERO

Para a análise da eficácia da cirurgia de ovariectomia (Tabela 2), após o sacrifício dos animais, o útero foi removido cuidadosamente e pesado úmido e, posteriormente, colocado na estufa para determinação do peso seco. Foi observada uma redução do peso uterino (atrofia) do grupo ovariectomizado, (p<0.05).

	SHAM	OVX	SHAM ESPIRO	OVX ESPIRO
Peso do útero úmido	0,75±0,02	0,11±0,008*	0,73±0,04	0,10±0,007*#
Peso do útero	0,13±0,005*	0,02±0,0009*#	0,13±0,01*	0,02±0,002*#

seco

Tabela 2: Comparação do peso do útero (em gramas) entre os grupos sham cmc (n=6), sham Final (n=6), Ovx (n=7) e Ovx Final (n=7). Sham Espiro(n=6), Sham Espiro Final (n=6), Ovx Espiro (n=6) e Ovx Espiro Final (n=6). *p<0,05 vs Sham Peso Úmido; #p<0,05 Sham Seco; \$p<0,05 Ovx Peso Úmido, ANOVA 1 via, seguida de pós teste de Tukey para comparações múltiplas.

5.2 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

O efeito da espironolactona por 8 semanas, sobre a pressão arterial foi avaliada em todos os grupos. No final do tratamento, a PAS dos animais tratados não foi alterada, o mesmo foi observado nos animais controle. Portanto não houve diferença entre as PAS, PAD, PAM e FC entre os grupos (Tabela 3).

	SHAM	OVX	SHAM ESPIRO	OVX ESPIRO
PAS	112±4	112±4	107±2	106±3
PAD	69±3	72±4	65±4	69±1
PAM	87±3	86±4	84±4	77±1
FC	274±8	262±12	304±15	283±19

Tabela 3: Valores da pressão arterial sistólica (PAS) obtidos por meio de hemodinâmica em ratas dos grupos Sham, Ovx, Sham Espiro e Ovx Espiro após dois meses de tratamento, N=6 para todos os grupos, os resultados estão expressos como média ± EPM. P<0, 05, ANOVA 1 via.

5.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM ESPIRONOLACTONA SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA E DE ARTÉRIA DE RESISTÊNCIA DE FÊMEAS OVARIETOMIZADAS

A fenilefrina (agonista α_1 adrenérgico) promoveu resposta vasoconstritora concentração-dependente nos anéis de aorta e mesentérica de animais dos grupos Sham e Ovx (Figura 8). Diante disso, foi observado que anéis de aorta

de ratas ovariectomizadas apresentaram maior responsividade contrátil à fenilefrina, em comparação com anéis de aorta do grupo sham.

À resposta máxima à fenilefrina foram maiores nos segmentos de aorta dos animais do grupo Ovx quando comparado ao grupo Ovx Espiro (Figura 8A). Mostrando que o tratamento com espironolactona foi capaz de prevenir o aumento da resposta máxima à fenilefrina em aorta isolada do grupo Ovx (Figura 8A) (Tabela 4). Em anéis de aorta do grupo sham não houve alteração quando comparado aos anéis de aorta tratados com espironolactona (Figura 8A). No leito mesentérico não houve nenhuma diferença entre os grupos (Figura 8B).

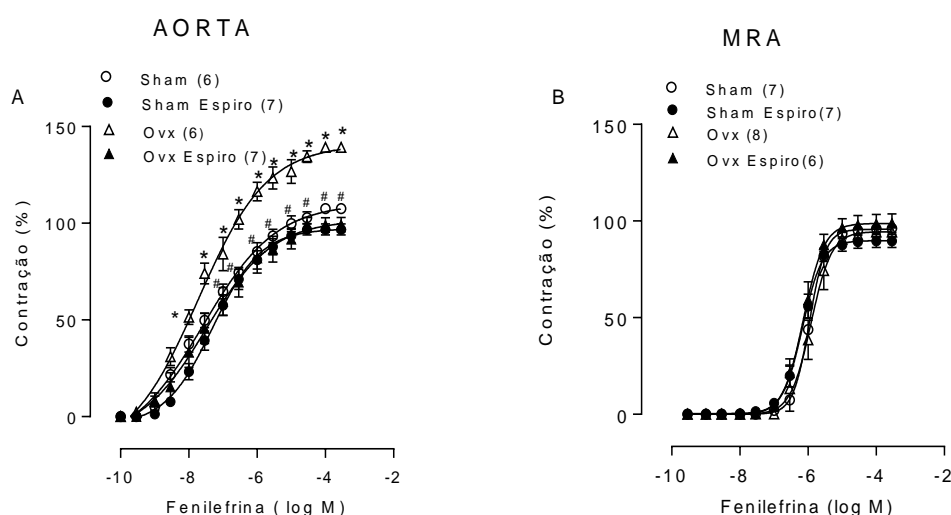


Figura 8: Resposta contrátil induzida por fenilefrina, em segmentos de artéria aorta torácica (A) e artérias mesentéricas de resistência (B) de ratas dos grupos controle (Sham) e tratado com espiro. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM (aorta) e 120 (mesentérica) mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. $p^* < 0,05$ vs Ovx Espiro, $^{\#}p < 0,05$ vs Ovx, ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni.

Tabela 4– Valores de pD2 e Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina (Fe 0,1 nM – 0,3 mM) em anéis de aorta e mesentérica.

	R máx			
	SHAM	OVX	SHAM ESPIRO	OVX ESPIRO
Fenil Aorta	107 \pm 1,1	139 \pm 1,1*	96 \pm 2,8*	99 \pm 3,7 [#]

Fenil MRA	94±3,7	94,5,4	89±3,3	99±4,5
-----------	--------	--------	--------	--------

Valores expressados como média ± EPM. *p < 0,05 vs sham; #p<0,05 vs ovx; ANOVA uma via e pós-teste de Tukey

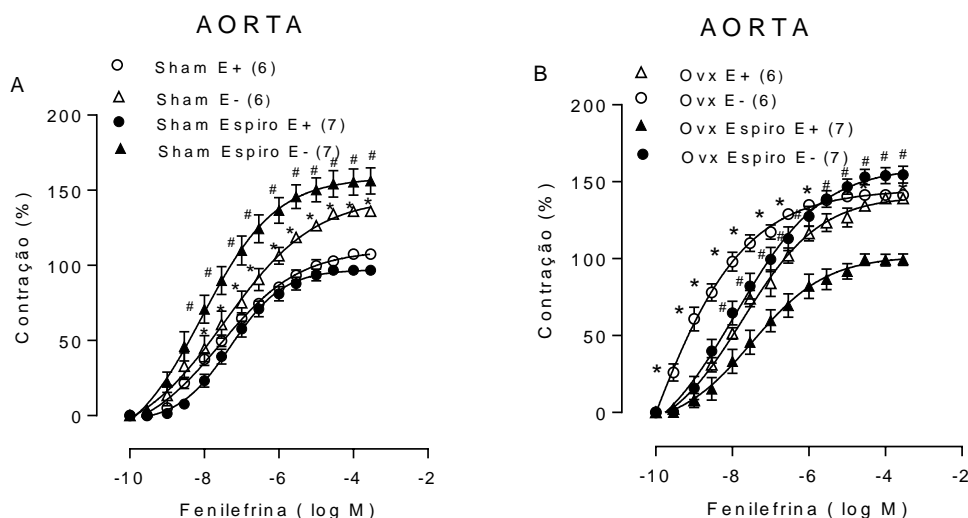
PD ₂				
	SHAM	OVX	SHAM ESPIRO	OVX ESPIRO
Fenil Aorta	7,47±0,08	8,03±0,06	7,24±0,14	7,42±0,34
Fenil MRA	6,04±0,14	5,96±0,12	6,20±0,08	5,99±0,15

Valores expressados como média ± EPM. ANOVA uma via

5.4 AVALIAÇÃO DAS VIAS ENDOTELIAIS NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA EM ANÉIS DE AORTA

A fim de avaliar a modulação endotelial na resposta vascular à fenilefrina em ratas Ovx, a camada endotelial foi removida mecanicamente em anéis de aorta e a ausência desta estrutura foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina (10 µM) induzir relaxamento menor que 10% no teste do endotélio.

Na aorta, a ausência do endotélio promoveu aumento significativo da R_{máx} à fenilefrina em ratas Sham (Figura 9B) (Tabela 5). O aumento de reatividade à FE na ausência do endotélio mostrou-se amplificado após tratamento com bloqueador de MR em ambos os grupos (Figura 13 C-D).



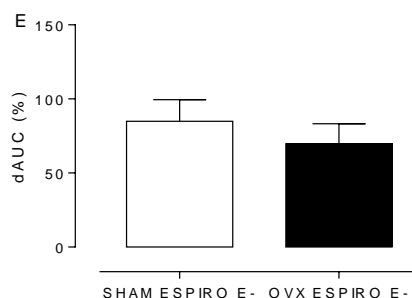


Figura 9: A,B) Curvas concentração-resposta à fenilefrina realizadas em anéis de aorta com presença (E+) ou ausência de endotélio (E-) em ratas dos grupos controle Sham e Ovx, tratados Sham Espiro, Ovx Espiro. Comparação entre os grupos através do cálculo da área abaixo da curva (dAUC). O número de animais usados está indicado entre parênteses. Gráfico A: * $p < 0,05$ vs Sham E+, # $p < 0,05$ Sham Espiro E+. Gráfico B * $p < 0,05$ vs Ovx E+, # $p < 0,05$ Ovx Espiro E+. , ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni.

Tabela 5– Valores de pD_2 e R_{max} obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina (Fe, 0,1 nM – 0,3 mM) em anéis de aorta com e sem endotélio.

R _{máx}				
	SHAM	OVX	SHAM ESPIRO	OVX ESPIRO
E+	107±1,1	139±1,1	96±2,8	99±3,7
E-	136±1,5 ^{*#}	141±0,9	156±8,7 ^{\$}	154±5,4 [!]

Valores expressados como média ± EPM. * $p < 0,05$ vs sham E+, # $p < 0,05$ vs sham espiro E-, \$ $p < 0,05$ vs sham espiro E+; ! $p < 0,05$ vs ovx espiro E+. ANOVA uma-via

PD ₂				
	SHAM	OVX	SHAM ESPIRO	OVX ESPIRO
E+	7,47±0,08	8,03±0,06	7,24±0,14	7,42±0,34
E-	7,93±0,68	9,10±0,12	8,09±0,25	8,05±0,45

Valores expressados como média ± EPM. ANOVA uma-via

5.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM ESPIRONOLACTONA SOBRE O RELAXAMENTO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA E DE ARTÉRIA DE RESISTÊNCIA DE FÊMEAS OVARIETOMIZADAS

A acetilcolina induziu relaxamento em todos os segmentos arteriais estudados (Figura 10). No entanto, em segmentos isolados de aorta de ratas Ovx o tratamento com espironolactona melhorou o relaxamento (Figura 10A), enquanto que na mesentérica não houve diferença em nenhum dos grupos (Figura 10B) (Tabela 6)

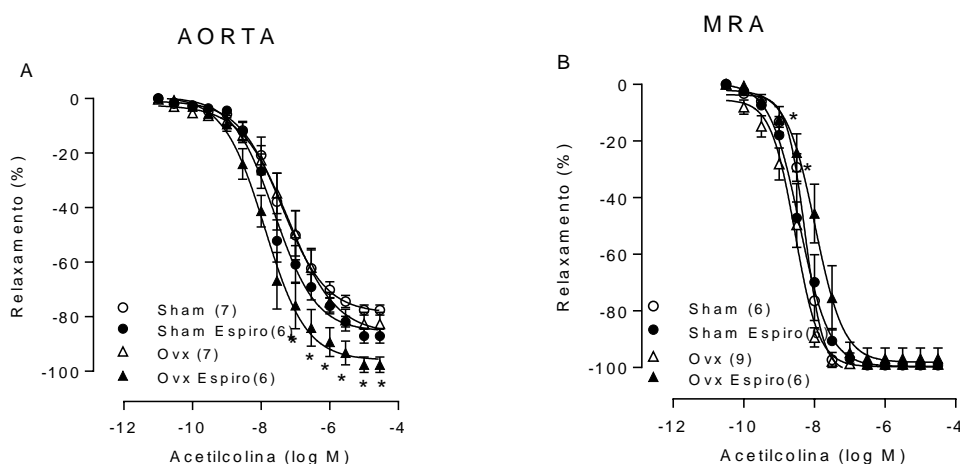


Figura 10: Resposta dilatadora induzida pela acetilcolina (ACh) em segmentos de artéria aorta (A) e artéria mesentérica (B) de ratas dos grupos Sham e Ovx. Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contracção à FE. O número de animais usados está indicado entre parênteses. $p < 0,05$ vs Ovx, ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni.

Tabela 6 – Valores de pD_2 e R_{max} obtidos das curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta e mesentérica.

	R_{max}			
	SHAM	OVX	SHAM ESPIRO	OVX ESPIRO
Ach Aorta	77 \pm 1,8	82 \pm 4,2	87 \pm 2,5	97 \pm 2,9 [*]
Ach MRA	101 \pm 1,8	98 \pm 1,0	99 \pm 0,8	88 \pm 5,7

Valores expressados como média \pm EPM. ^{*} $p < 0,05$ vs ovx; ANOVA uma-via e pós teste de Tukey

	PD_2			
	SHAM	OVX	SHAM ESPIRO	OVX ESPIRO
Ach Aorta	7,32 \pm 0,26	7,21 \pm 0,22	7,51 \pm 0,25	7,76 \pm 0,20
Ach MRA	8,25 \pm 0,07	8,61 \pm 0,10	8,31 \pm 0,15	8,1 \pm 0,19

Valores expressados como média \pm EPM. ANOVA uma-via

5.6 EFEITOS DA ESPIRONOLACTONA SOBRE A RESPOSTA DILATADORA AO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO (NPS) EM AORTA E ARTÉRIA MESENTÉRICA

Para avaliar se o tratamento com espironolactona durante 8 semanas, seria capaz de alterar o relaxamento independente do endotélio, foram realizadas, curvas concentração-resposta ao NPS em anéis de aorta e mesentérica.

Ao avaliar a resposta relaxante independente do endotélio, utilizando o NPS, observamos que a resposta de relaxamento do músculo liso promovida pelo fármaco nos anéis de aorta levou a diferença apenas em alguns pontos da curva concentração resposta (Figura 11A), embora esses pontos tenham dado diferença as análises feitas através R_{\max} e PD_2 não demonstraram diferença entre as curvas (Tabela 7), no entanto em anéis de mesentéricas não houve nenhuma diferença (Figura 11B), sugerindo que a resposta é dependente do endotélio.

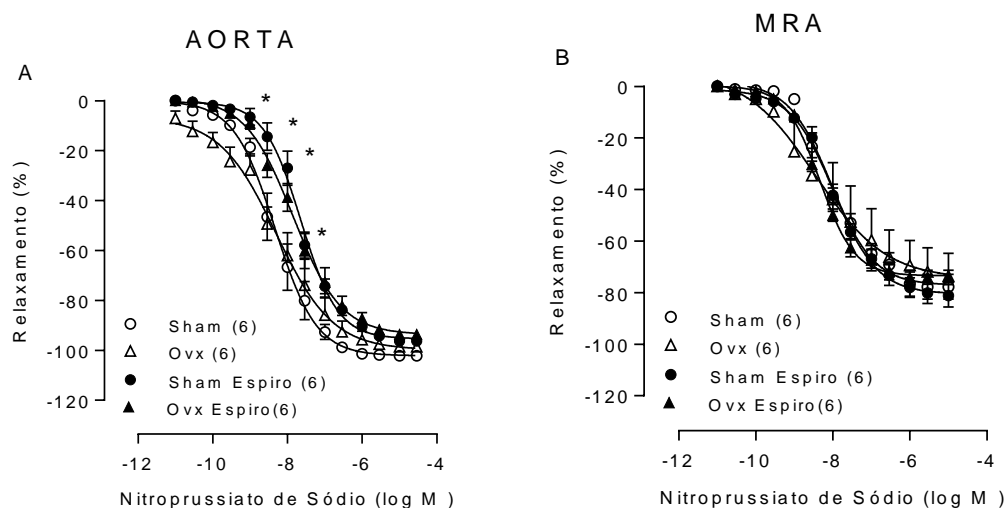


Figura 11: Resposta dilatadora induzida pelo nitroprussiato de sódio (NPS) em segmentos de artéria aorta (A) e artéria mesentérica (B) de ratas dos grupos controle e tratado. Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contracção à FE. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Resultados expressados como média \pm EPM. $p^* < 0,05$ vs Ovx, ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni.

Tabela 7- Valores de pD2 e Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à NPS em anéis de aorta e mesentérica

R _{max}				
	SHAM	OVX	SHAM ESPIRO	OVX ESPIRO
NPS Aorta	99±1,6	98±2,1	96±0,9	93±0,8
NPS MRA	77±4,7	73±8,8	83±4,5	73±3,1

Valores expressados como média ± EPM. ANOVA uma-via

PD ₂				
	SHAM	OVX	SHAM ESPIRO	OVX ESPIRO
NPS Aorta	8,29±0,18	8,28±0,24	7,69±0,14	7,80±0,19
NPS MRA	7,53±0,13	7,47±0,33	7,50±0,11	7,81±0,03

Valores expressados como média ± EPM. ANOVA uma-via

5.7 EFEITO DOS FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO TRATAMENTO COM ESPIRONOLACTONA SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA.

5.7.1 Participação do Óxido Nítrico na Resposta Vasoconstritora à Fenilefrina em Anéis Isolados de Aorta e de Artéria de Resistência de Fêmeas Ovariectomizadas

A incubação com L-NAME deslocou para a esquerda as curvas concentração-resposta à fenilefrina em ambos os grupos em segmentos aórticos (sham e ovx)(Figura 12A). No entanto, esse efeito foi menor em aorta isolada do Ovx conforme demonstrado pela área abaixo da curva (Figura 12C) e, o tratamento com espirolactona reverteu esse efeito, sugerindo uma restauração da biodisponibilidade de NO em aorta isolada de ratas ovx e sham (Figura 12B).

Nas artérias mesentéricas o L-NAME induziu aumento da sensibilidade à fenilefrina nos grupos ovx (Figura 12D)(Tabela 9). E nas ratas tratadas com

espironolactona houve uma diferença na resposta máxima no grupo Sham espiro L-NAME, quando comparado ao controle (Figura 12D)(Tabela 9).

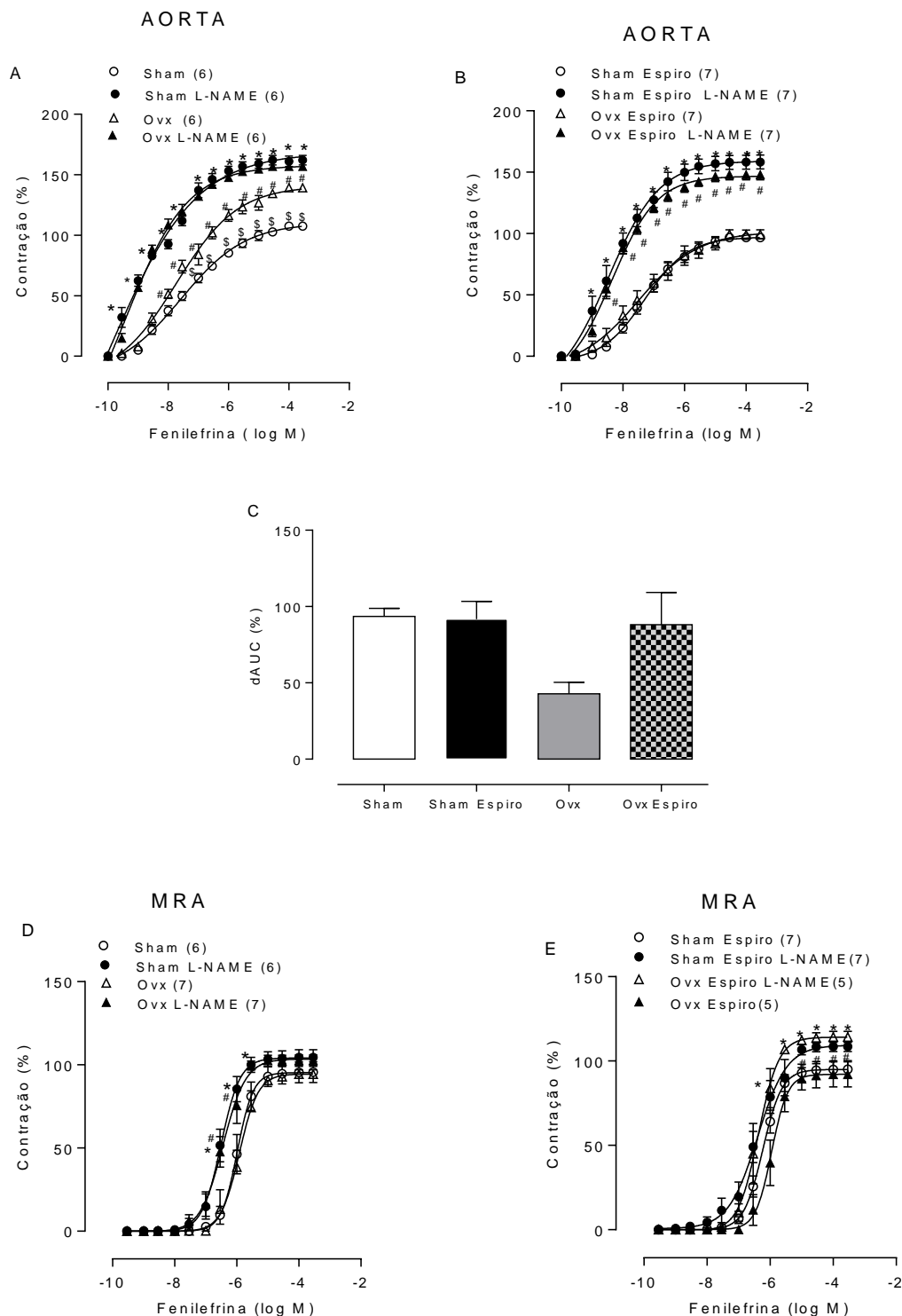


Figura 12: Efeito do L-NAME (100 μ M), inibidor da sintase do óxido nítrico, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de aorta (A,B) e artérias mesentérica de resistência (D,E) de ratas dos grupos controle Sham e Sham +LNAME, Ovx cmc e Ovx +LNAME, e tratados: Sham Espiro e Sham Espiro+LNAME, Ovx Espiro e Ovx Espiro+LNAME. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por

75 mM (aorta) e 120 mM (mesentérica) de KCl. Comparação entre os grupos através do cálculo da área abaixo da curva (dAUC). O número de animais usados está indicado entre parênteses. Resultados expressados como média \pm EPM. $^{\$}p<0,05$ vs Ovx, $^{*}p<0,05$ vs Sham, $^{\#}p<0,05$ vs Ovx L-Name. Gráfico B: $^{*}p<0,05$ vs Sham Espiro, $^{\#}p<0,05$ vs Ovx Espiro, Gráfico D: $^{*}p<0,05$ vs Sham, $^{\#}p<0,05$ vs Ovx. Gráfico E: $^{*}p<0,05$ vs Ovx Espiro, $^{\#}p<0,05$ vs Sham Espiro. ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni.

5.7.2 Participação de Espécies Reativas de Oxigênio na Resposta Vasoconstritora à Fenilefrina em Anéis Isolados de Aorta e de Artéria de Resistência de Fêmeas Ovariectomizadas

Evidências sugerem que o aumento da produção de ROS durante a privação de estrogênio pode levar a o desenvolvimento de disfunção endotelial. É reconhecido que a biodisponibilidade de óxido nítrico pode ser reduzida por espécies reativas de oxigênio (ROS), tendo como consequência o aumento da contração vascular. Diante disso, investigamos a influência das espécies reativas de oxigênio na resposta contrátil à fenilefrina em animais com deficiência nos níveis de estrogênio.

Assim, para avaliar essa via, as artérias aorta e mesentérica foram incubadas com um “varredor” de ânion superóxido: Tiron (1mM); um inibidor da NADPH oxidase: apocinina (10 μ M); e um “varredor” de peróxido de hidrogênio: catalase (1000 U·mL⁻¹).

Como observado nas Figuras 13A, a incubação com Tiron reduziu a R_{max} à fenilefrina em aorta do grupo Ovx, reduziu tanto a R_{máx} como a sensibilidade à fenilefrina (Tabela 8). Esses dados sugerem uma maior liberação de espécies reativas de oxigênio em aorta isolada do grupo Ovx.

Foi observado que no modelo de deficiência estrogênica (grupo Ovx), o tratamento com espironolactona não modificou a reatividade à fenilefrina na presença de Tiron em aorta, sugerindo que o bloqueio do receptor de mineralcorticóide aboliu a liberação de ROS (Figura 13B). Esse mesmo efeito foi observado em aorta do grupo Sham (Figura 13B).

Em artérias mesentéricas não houve nenhuma mudança entre os grupos controle (Figura 13C) e tratado com espironolactona (Figura 13D) na presença de Tiron (Tabela 9)

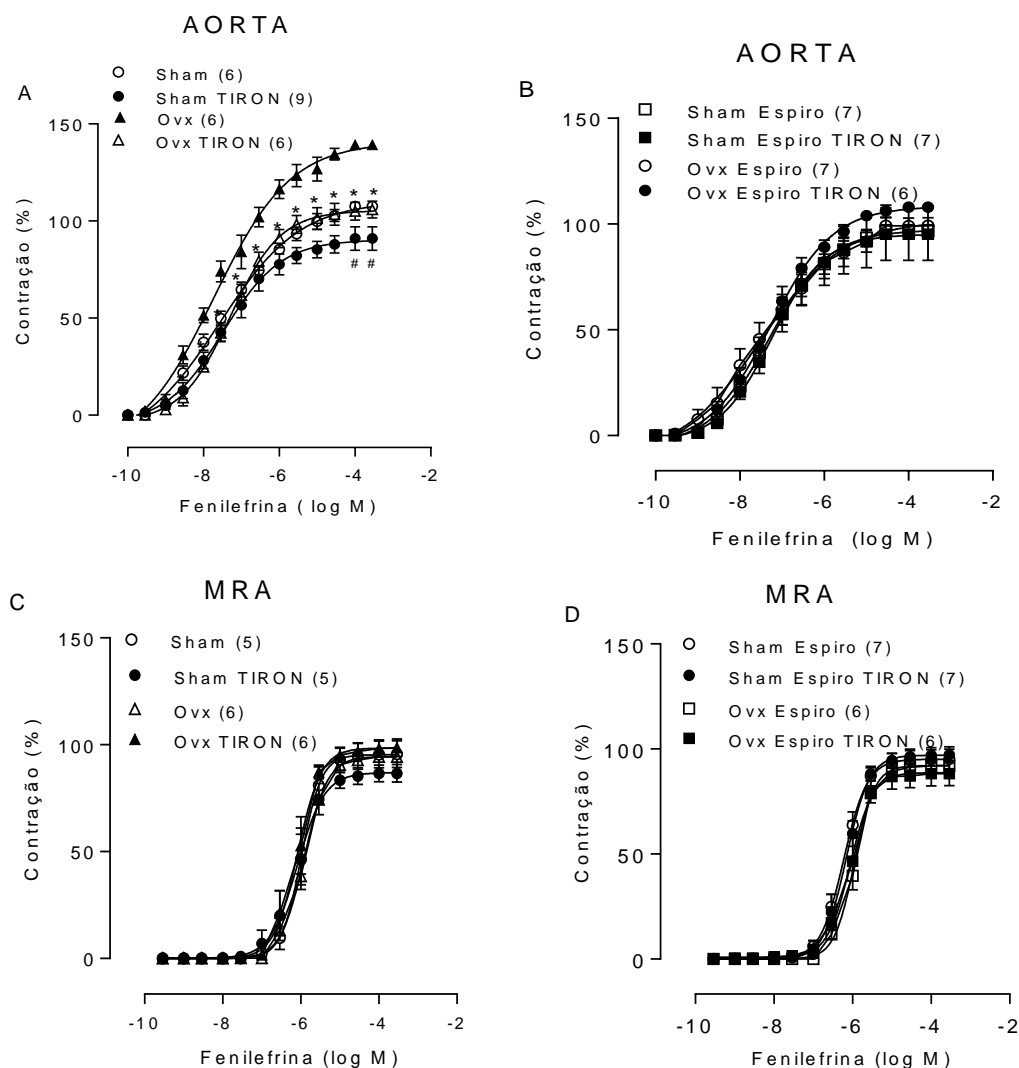


Figura 13: Efeito do Tiron (1 mM), varredor de ROS, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de aorta (A,B) e artérias mesentérica de resistência (C,D) de ratas dos grupos controle Sham e Sham+Tiron, Ovx e Ovx+Tiron, e tratados: Sham Espiro e Sham Espiro+Tiron, Ovx espiro e Ovx Espiro+Tiron. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM (aorta) e 120 mM (mesentérica) de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Resultados expressados como média \pm EPM. Gráfico A; * $p < 0,05$ vs Ovx, # $p < 0,05$ vs Sham, ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni.

A apocinina promoveu redução na resposta máxima e da sensibilidade à fenilefrina nos anéis de aorta dos animais dos grupos Ovx (Figura 14A), não ocorrendo no grupo Sham (Figura 14A)(Tabela 8). Entretanto, o efeito da apocinina, nos grupos tratados com espironolactona restaura a resposta da Ovx para o mesmo nível de Sham (Figura 14B). Em artérias mesentéricas, houve diferença em alguns pontos da curva do grupo sham apo quando comparado ao sham, porém não houve diferença quanto à sensibilidade (Figura 14C) e Rmax quando a NADPH oxidase foi inibida em nenhum dos grupos (Figura 14D)(Tabela 9).

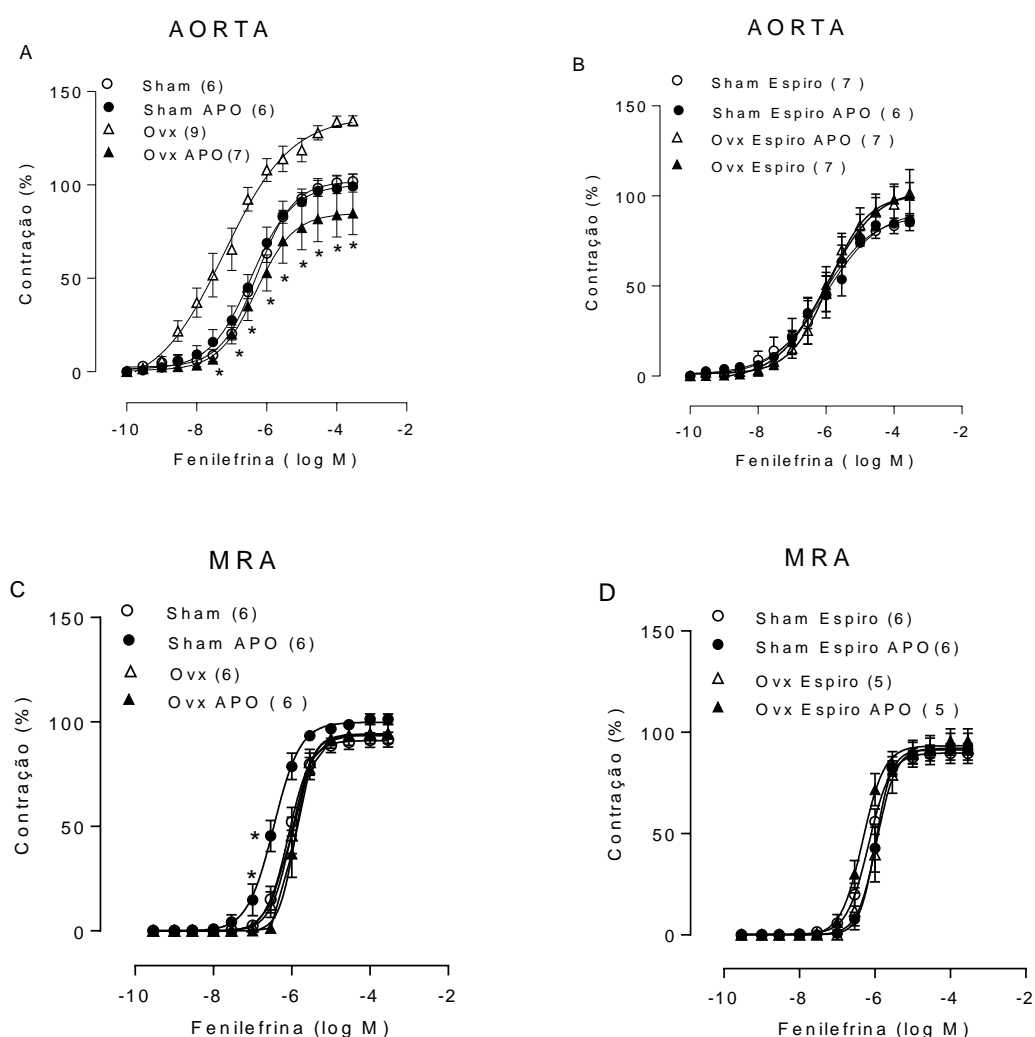


Figura 14: Efeito do Apocinina scavenge de NADPH, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de aorta (A,B) e artérias mesentérica de resistência (C,D) de ratas dos grupos controle Sham e Sham+Apocinina, Ovx e Ovx+Apocinina, e tratados: Sham Espiro e Sham Espiro+Apocinina, Ovx Espiro e Ovx Espiro+Apocinina. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM (aorta) e 120 mM (mesentérica) de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para

análise comparativa da resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) Gráfico A: *P<0,05 vs Ovx. Gráfico C: *p<0,05 vs Sham. ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni.

Na presença de catalase nenhuma diferença foi observada na reatividade da aorta do grupo Sham (Figura 15A), porém nas ratas Ovx houve um aumento na R_{máx} (Figura 15A) sugerindo a participação de peróxido de hidrogênio, na deficiência de estrogênio, sendo essa diferença abolida na presença da espironolactona (Figura 15B). Em artéria mesentérica não houve diferença em nenhum grupo (Figura 15C-D).

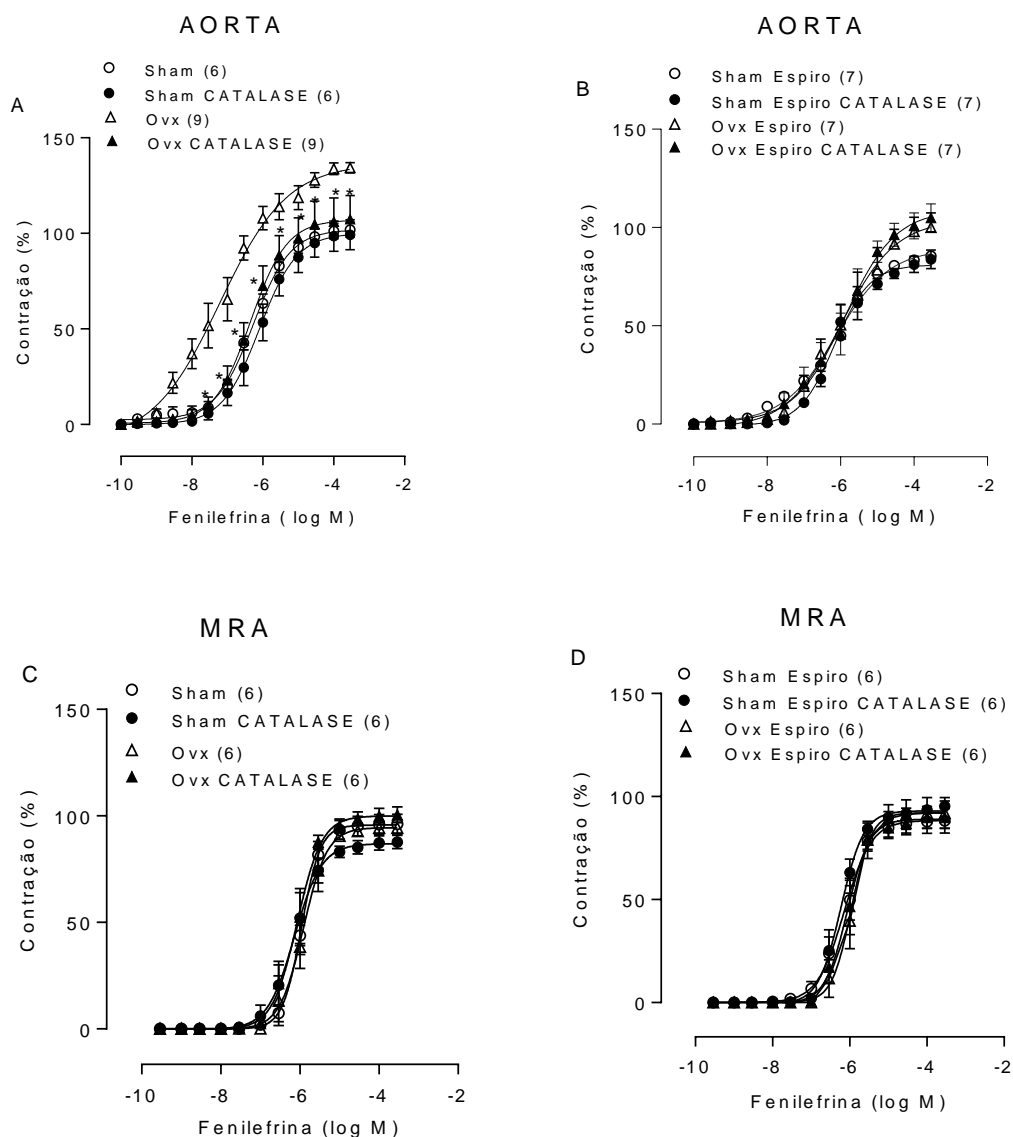


Figura 15: Efeito do Catalase inibidor da H₂O₂, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de aorta (A,B) e artérias mesentérica de resistência (C,D) de ratas dos grupos controle Sham e Sham+Catalase, Ovx e Ovx+Catalase, e tratados: Sham Espiro e Sham Espiro+Catalase, Ovx Espiro e Ovx Espiro+Catalase. Os resultados (média ± EPM)

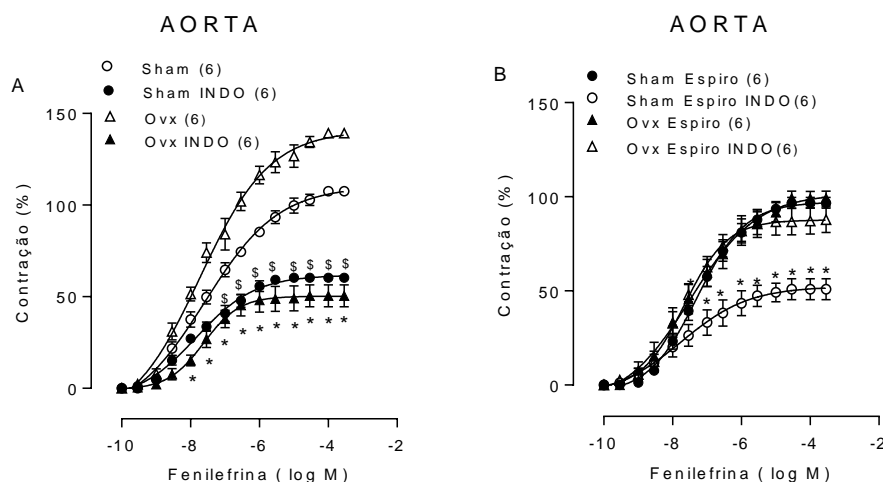
estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM (aorta) e 120 mM (mesentérica) de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) *P<0,05 vs Ovx, ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni.

5.7.3 Participação dos Prostanóides Derivados da Via da Ciclooxygenase (COX) na Resposta Contrátil a Fenilefrina em Anéis Isolados de Aorta e de Artéria de resistência de Fêmeas Ovariectomizadas

Para analisar a participação dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxygenase na resposta contrátil à fenilefrina em anéis de aorta e artérias mesentéricas, incubamos essas artérias com o inibidor da COX, a indometacina (10 μ M). A incubação com indometacina promoveu redução significativa da resposta contrátil à fenilefrina em aorta dos grupos sham e ovx, no entanto, a resposta foi maior em aorta isolada de ratas Ovx (Figura 16A) sugerindo maior liberação de prostanóides constrictores.

No entanto, o tratamento com espironolactona restaurou a reatividade à fenilefrina apenas no grupo Ovx (Figura 16), sugerindo o envolvimento da aldosterona no aumento da liberação de prostanóides constrictores neste grupo.

Em artéria mesentérica a incubação com indometacina reduziu a resposta máxima à fenilefrina apenas no grupo Sham, o qual foi restaurada após tratamento com espironolactona (Figura 16C) (Tabela 9)



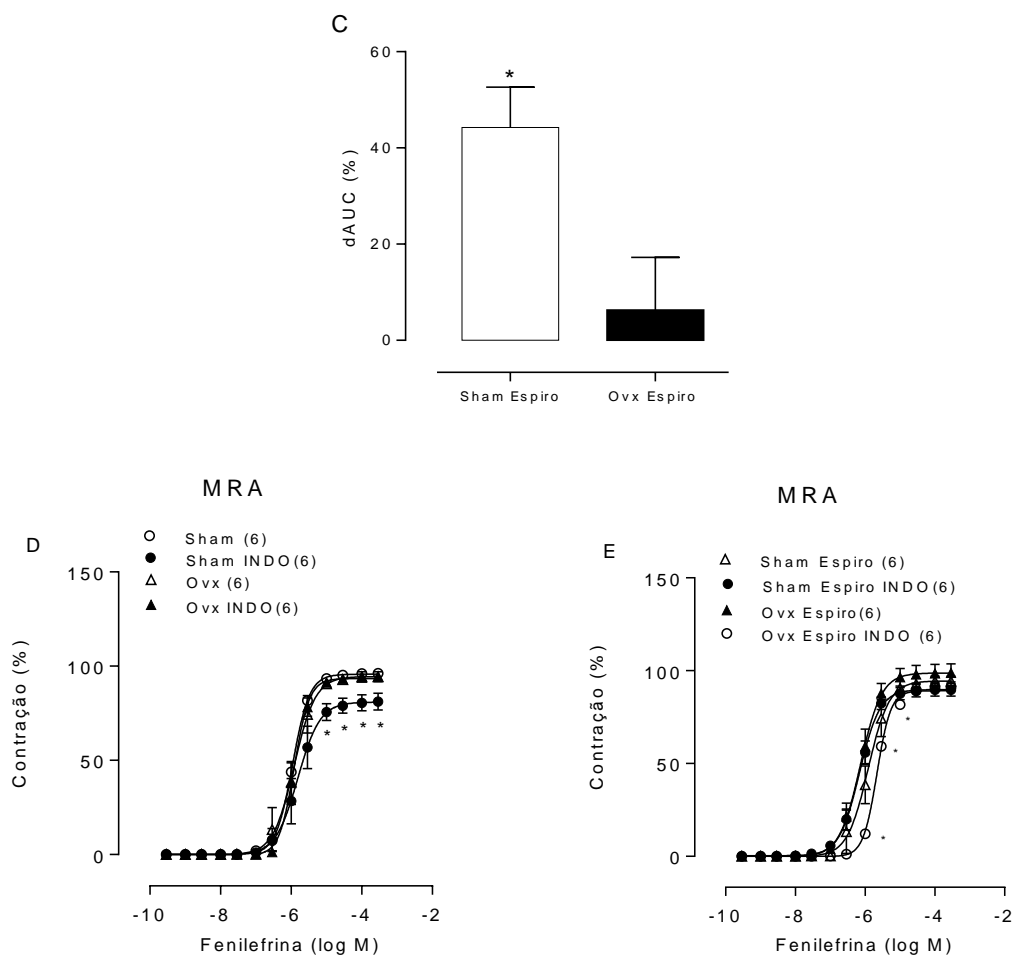


Figura 16: Efeitos da indometacina (10 μ M), inibidor da ciclooxigenase, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (Fe) em segmentos de aorta (A,B) e artérias mesentéricas (C,D) de ratas dos grupos controle Sham e Sham+INDO, Ovx e Ovx+INDO, e tratados Sham Espiro e Sham Espiro+INDO, Ovx Espiro e Ovx espiro+INDO. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM (aorta) e 120 mM (mesentérica) de KCl. Comparação entre os grupos através do cálculo da área abaixo da curva (dAUC). O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) Gráfico A: *P<0,05 vs Ovx, ^SP<0,05 vs Sham. Gráfico B: *P<0,05 vs sham espiro. Gráfico D: *P<0,05 vs Sham. Gráfico E: *P<0,05 Ovx Espiro. ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni.

Tabela 8 – Valores de pD₂ e de resposta máxima (R_{máx}, % de contração) obtidos através de curvas concentração-resposta à fenilefrina em artéria aorta de ratas sham, ovx, sham espiro e ovx espiro nas condições: Fenil e após incubação com L-NAME, Tiron, Apocinina, Catalase ou indometacina.

Rmax (% contração)				
	SHAM	OVX	SHAM ESPIRO	OVX ESPIRO
Fenil	107±1,1	139±1,1	96±2,8	99±3,7
L-Name	162±3,9*	156±4,2*	158±5,6*	148±4,1*
Tiron	90±6,0	105±4,2*	95±12	108±2,4
Apocinina	99±6,5	84±1,37*	86±2,8	101±7,3
Catalase	99±7,8	107±12*	83±4,7	105±7,0
Indometacina	60±1,8*	39±5,7*	50±5,5*	87±6,7

Valores expressados como média ± EPM. *p < 0,05 vs curva controle (Fenil), ANOVA uma-via e pós-teste deTukey.

PD ₂				
	SHAM	OVX	SHAM ESPIRO	OVX ESPIRO
Fenil	7,47±0,08	8,03±0,06	7,24±0,14	7,42±0,34
L-Name	9,19±0,09*	9,05±0,06*	8,68±0,37*	8,42±0,14*
Tiron	7,09±0,19	7,27±0,11*	7,26±0,08	7,29±0,19
Apocinina	6,55±0,19	6,26±0,13*	6,03±0,25	6,07±0,20
Catalase	6,23±0,18	6,36±0,13*	6,15±0,17	6,12±0,27
Indometacina	5,67±0,18*	7,95±0,33	7,57±0,38	7,82±0,24

Valores expressados como média ± EPM. *p < 0,05 vs curva controle (Fenil), ANOVA uma-via e pós-teste deTukey.

Tabela 9– Valores de pD₂ e de resposta máxima (R_{máx}, % de contração) obtidos através de curvas concentração-resposta à fenilefrina em artéria mesentérica de ratas sham, ovx, sham espiro e ovx espiro nas condições: Fenil e após incubação com L-NAME, Tiron, Apocinina, Catalase ou Indometacina.

R _{máx}				
	SHAM	OVX	SHAM ESPIRO	OVX ESPIRO

Fenil	94±3,7	94±5,4	89±3,3	99±4,5
L-Name	104±4,6	102±3,5	108±2,9*	114±3,2
Tiron	85±2,5	94±3,0	101±6,8	88±5,8
Apocinina	101±2,4	94±1,6	91±2,8	95±5,7
Catalase	87±3,1	100±3,6	95±2,4	89±5,3
Indometacina	81±4,4	94±1,5	91±2,8	91±5,3

Valores expressados como média ± EPM. *p < 0,05 vs curva controle (Fenil), ANOVA uma-via e pós-teste deTukey.

PD ₂				
	SHAM	OVX	SHAM ESPIRO	OVX ESPIRO
Fenil	6,04±0,14	5,96±0,12	6,20±0,08	5,99±0,15
L-Name	6,52±0,11	6,48±0,15*	6,47±0,19	6,38±0,18
Tiron	6,16±0,22	6,12±0,13	6,16±0,08	6,11±0,12
Apocinina	6,49±0,12	5,90±0,08	6,00±0,08	6,31±0,08
Catalase	6,19±0,18	6,12±0,13	6,24±0,10	6,09±0,11
Indometacina	5,83±0,16	5,91±0,08	6,00±0,08	5,66±0,10

Valores expressados como média ± EPM. *p < 0,05 vs curva controle (Fenil), ANOVA uma-via e pós-teste deTukey.

5.8 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO (O₂⁻) *IN SITU* ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA PRODUZIDA PELA OXIDAÇÃO DO DIHIDROETÍDIO (DHE)

Para verificar a influência da ovariectomia por 60 dias e do tratamento com espirinolactona sobre a produção de O₂⁻ *in situ* foi utilizada a técnica de fluorescência produzida pela oxidação do DHE.

Portanto, corroborando com os resultados funcionais encontrados, a produção de O₂⁻ foi significativamente maior nos anéis de aorta de animais com

deficiência estrogênica quando comparado as ratas tratadas com espironolactona. (Sham Cmc $58,8 \pm 2,87$, $n=7$; Ovx Cmc $203,8 \pm 7,66$, $n=7$; Sham Espiro $29,1 \pm 5,20$, $n=7$; Ovx Espiro $33,3 \pm 4,07$ $p < 0,05$) (Figura 17).

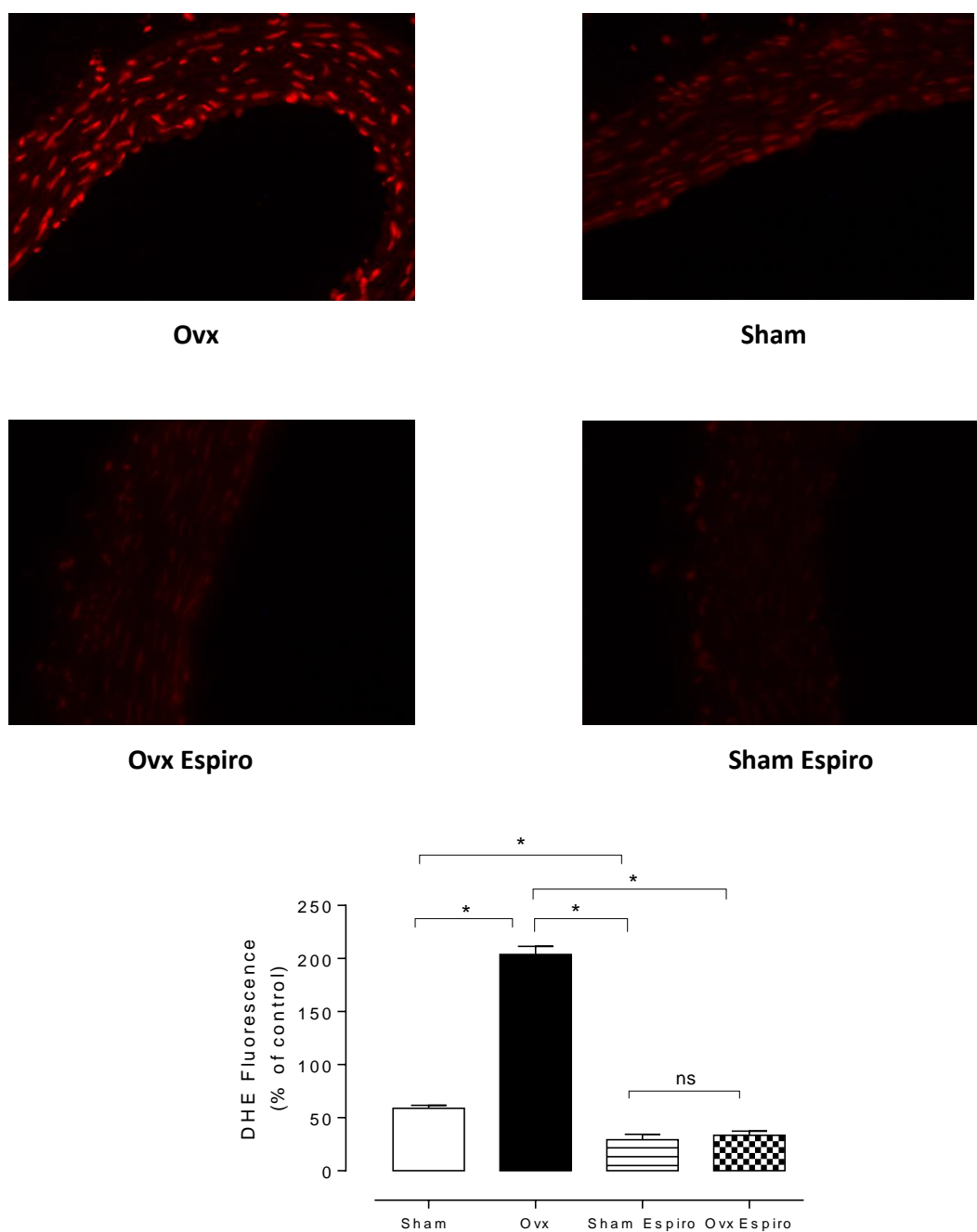


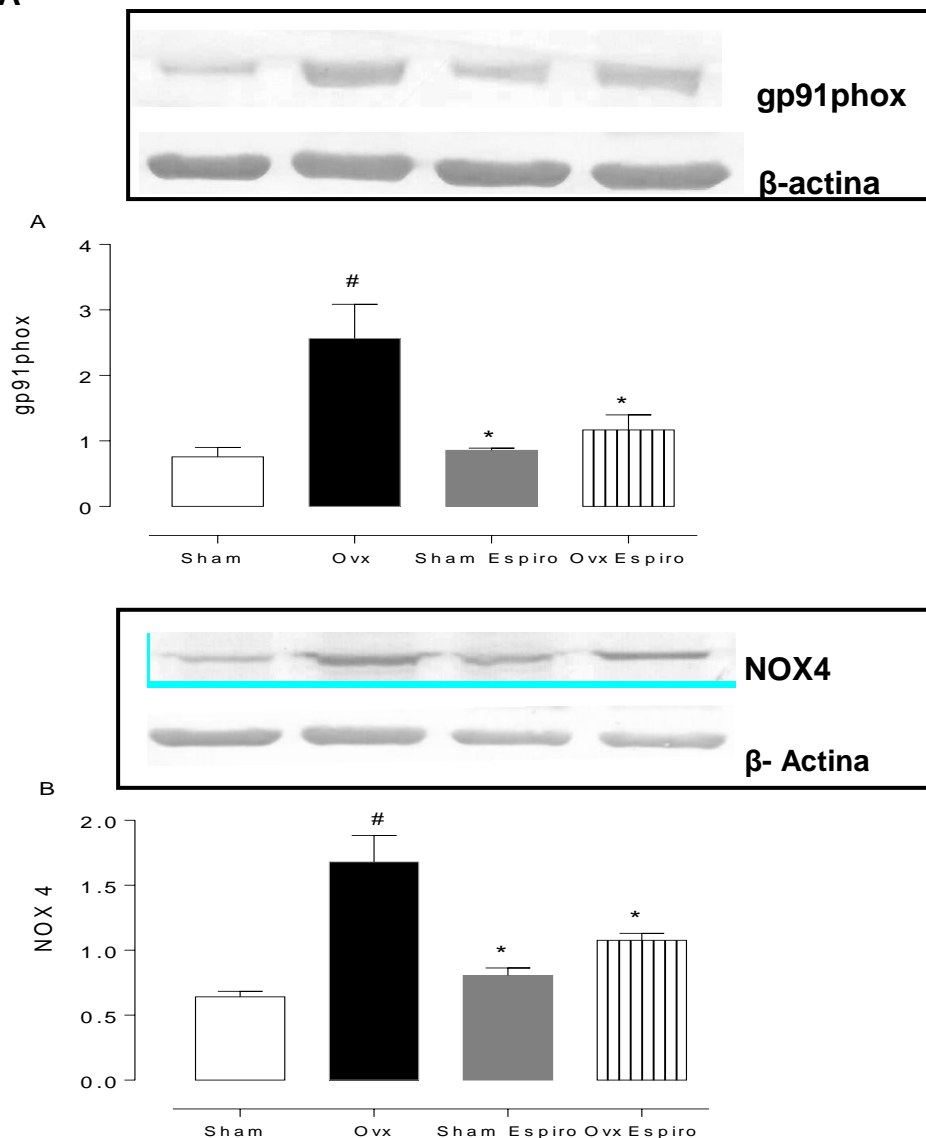
Figura 17: Imagens de micrografia representam a fluorescência emitida por dihidroetídio em segmentos de ratas dos grupos Ovx, Sham, Ovx Espiro e Sham Espiro. Gráfico com valores médios da fluorescência emitida por dihidroetídio. Anova duas vias.* $p < 0,05$. Aumento de 40x para fotografar.

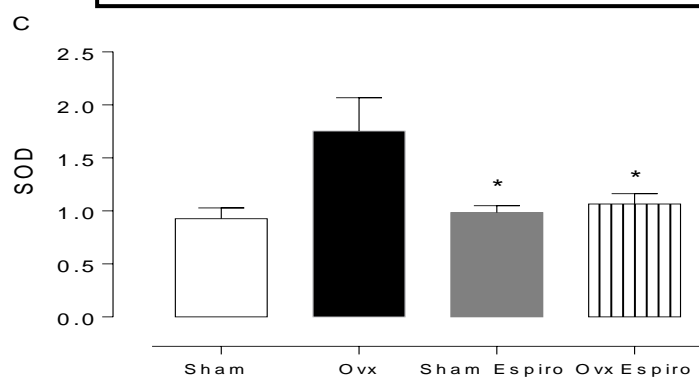
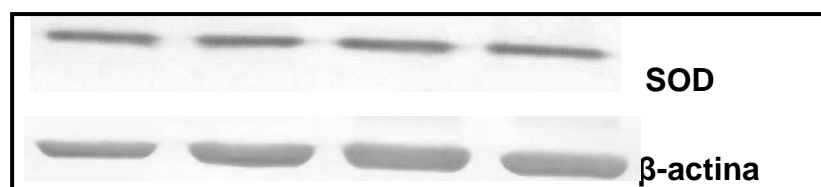
5.9 EXPRESSÃO GÊNICA DE NOX4, gp91phox e SOD EM AORTA E EM MESENTÉRICA

Após observar que a ovariectomia aumenta a produção de EROs, o próximo passo foi analisar a expressão das isoformas da NADPH oxidase gp91phox e NOX4. Nossos resultados sugerem que os níveis dessas isoformas descritas estão aumentadas no grupo Ovx cmc de anéis de aorta, não havendo diferença entre os grupos na artéria de resistência (Figura 18 A-B). O aumento da gp91phox pode ser uma das principais subunidades que contribuem para o estresse oxidativo vascular nas enfermidades cardiovasculares (DRUMMOND *et al.*, 2011).

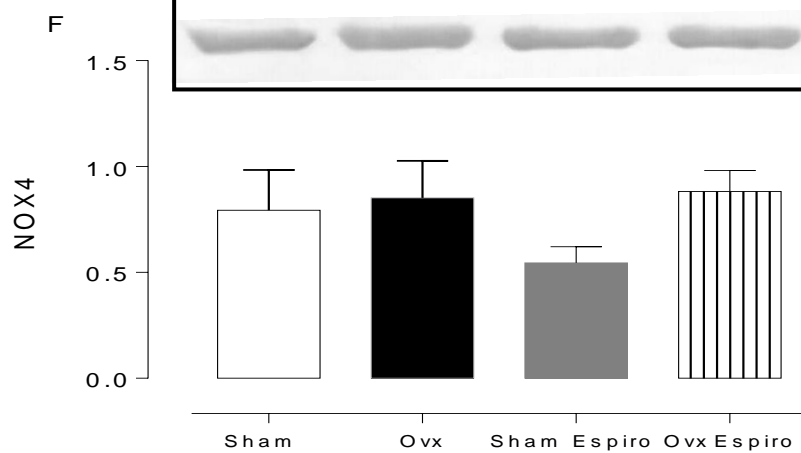
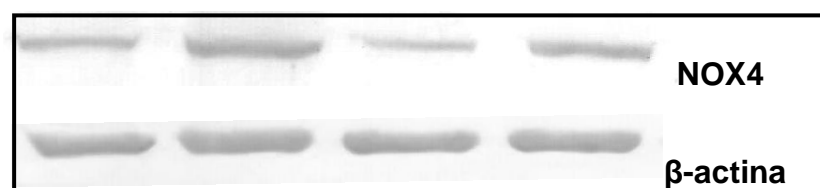
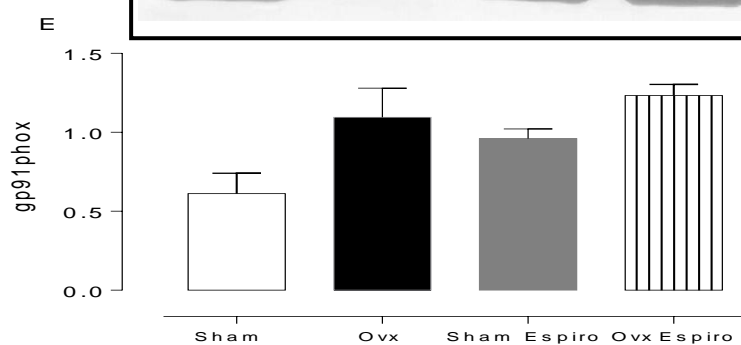
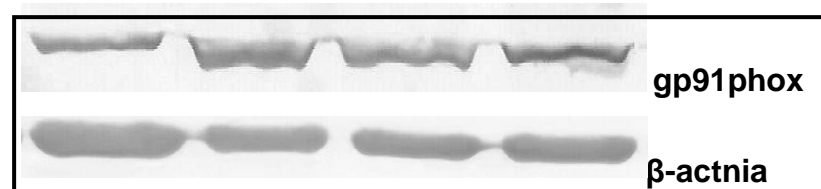
Analizamos também se a ovariectomia poderia alterar a expressão das enzimas antioxidantes SOD. Similar ao que encontramos em artéria aorta, a expressão da proteína SOD foi aumentada em artérias ovx cmc (Figura 18 C). No entanto, a expressão proteica da SOD em mesentérica não foi afetada (Figura 18 E-F-G).

AORTA





MESENTÉRICA



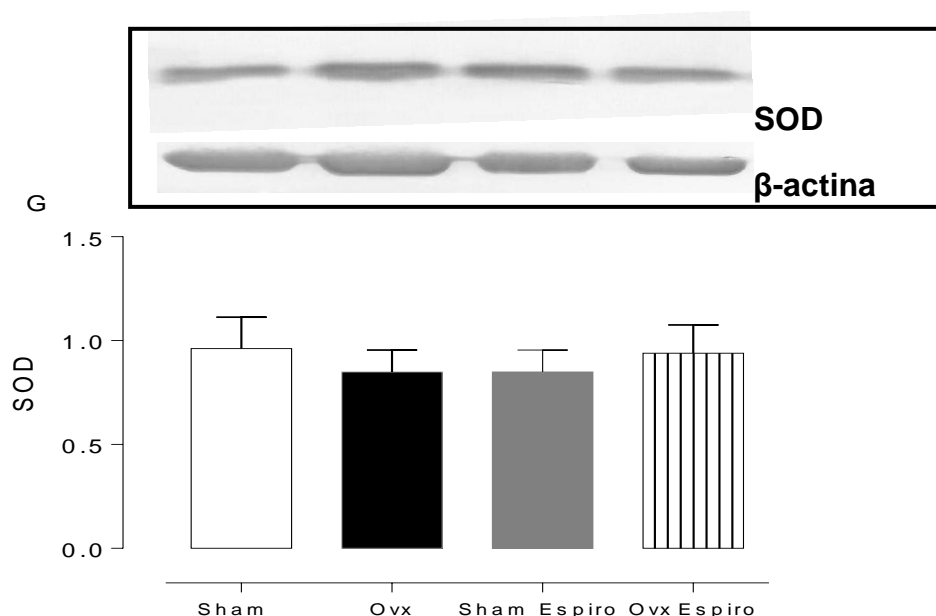


Figura 18: Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão de gp91phox, NOX 4, SOD e da β -actina. Os resultados (média \pm EPM) estão mostrados como expressão proteica da gp91phox, NOX 4, SOD em relação à β -actina. Para análise comparativa. Anova duas vias * $P < 0,05$ vs ovx; #vs sham.

5.10 ANÁLISE MALONDIALDEÍDO

Com o intuito de verificar se o estado oxidante (estresse oxidativo) é alterado pelo tratamento com espironolactona, foram realizadas medidas da produção de malondialdeído no plasma. Como observado na Figura 19, os níveis plasmáticos de malondialdeído foram reduzidos após tratamento com espironolactona após 8 semanas.

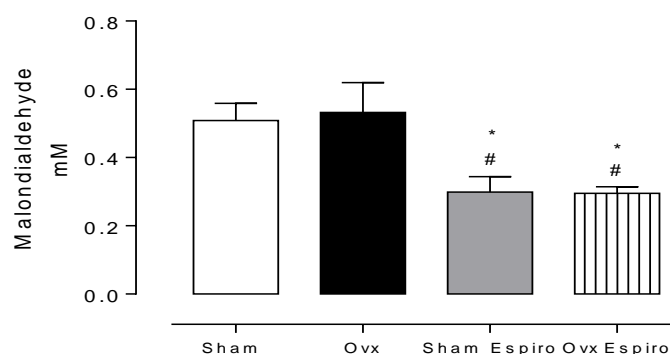


Figura 19: Medida da produção de MDA plasmática do grupo sham cmc, ovx cmc e sham espiro, ovx espiro. Dados estão expressos em média \pm EPM;. Anova duas vias, * $P > 0,05$ vs ovx; #vs sham.

6. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que o antagonista de MR a espironolactona impediu o aumento da resposta vasoconstritora à fenilefrina, na aorta de ratas, mas não em artéria de resistência, induzida pela deficiência de estrogênio após 8 semanas de privação hormonal. O efeito vascular protetor da espironolactona foi associado com aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico e redução da produção de superóxido derivado da NADPH oxidase.

O bloqueio de receptores MR não alterou a pressão arterial. Em mesentérica não houve alteração na reatividade entre os grupos sham e ovx, porém na aorta houve o aumento da reatividade a Fe quando comparado o grupo sham e ovx, e esse feito foi restaurado pelo bloqueio de MR, que também aumentou a resposta vasodilatadora em aorta de ratas ovx sugerindo que os efeitos benéficos do fármaco ocorrem sob vasos de condutância de ratas com deficiência de estrogênio.

Os dados sugerem que as alterações vasculares como a disfunção vascular observadas em aorta isolada de ratas ovx se devem ao aumento da produção de radicais livres derivados do oxigênio, principalmente o ânion superóxido, ocasionando redução da biodisponibilidade de NO em anéis de aorta do grupo ovx, concomitante a isso, ocorre aumento da participação de prostanóides vasoconstrictores derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase.

Os nossos resultados sugerem que a redução dos níveis de estrogênio e consequentemente o aumentos de ROS atuam em conjunto para produzir as alterações vasculares que podem contribuir para doenças cardiovasculares. Portanto este modelo proporciona um novo mecanismo pelo qual os antagonistas de MR podem ser protetores em mulheres na pós-menopausa, prevenindo a disfunção vascular associada à privação hormonal.

Com intuito de esclarecer os prejuízos causados pela insuficiência do estrogênio, e a resposta promovida pela espironolactona sobre a reatividade

vascular em anéis de aorta e mesentérica. Os resultados encontrados neste trabalho serão discutidos adiante.

6.1 EFEITO DA DEFICIÊNCIA DE ESTROGÊNIO SOBRE PARÂMETROS PONDERAIS.

Ao final do tratamento, como era esperado, houve um aumento do peso corporal de todos os grupos. Além disso, há um aumento significativo do peso das fêmeas ovx quando comparada as ratas sham , corroborando com dados da literatura (KLOOSTERBOER; EDERVEEN, 2002; YOSHITAKE et al., 1999). O procedimento de ovariectomia, que conduz a um ganho de peso corporal, também se associa a um aumento do consumo energético diário e ao aumento da massa gorda corporal (RYOU *et al.*, 2012).

O peso do útero também foi avaliado a fim de comprovar a eficácia da técnica de ovariectomia, ou seja, avaliar de forma indireta a deficiência de estrogênio. A utilização do peso do útero como parâmetro de eficácia da ovariectomia é bem descrita (CALIMAN et al., 2013; DE MEDEIROS et al., 2012; SATO et al., 1996).

6.2 EFEITO DA DEFICIÊNCIA DE ESTROGÊNIO SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL

Nossos dados mostraram que a deficiência de estrogênio em ratas jovens não altera valores da pressão sistólica e diastólica, o que corrobora com estudo de Ribeiro e colaboradores 2013, realizado em nosso laboratório em que parte do seu estudo avaliou a pressão arterial em ratas submetidas a ovariectomia por 8 semanas.

As artérias de resistência (ex: terceiro ramo da mesentérica) caracterizada por ter diâmetro menor 500 μm , tem um papel fundamental na resistência vascular total e, portanto na manutenção da homeostase pressórica (MULVANY & AALKJAER, 1990). A RVP é inversamente proporcional ao raio do vaso à

quarta potência e, portanto, diminuições no tamanho destas artérias, podem levar importantes aumentos na resistência periférica e, por conseguinte na pressão arterial (MULVANY & AALKJAER, 1990).

Assim notamos que o bloqueador de aldosterona age independente da alteração na pressão arterial. Esses resultados mostram que esse mineralcorticóide age independente no rim, vasculatura e coração (WEINBERGER *et al* 2002).

Para avaliar se a deficiência de estrogênio interfere na reatividade vascular, avaliamos a função contrátil a fenilefrina em anéis de aorta e mesentérica.

6.3 EFEITO DA ESPIRONOLACTONA SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA

As células do músculo liso vascular, assim como as demais células musculares, dependem diretamente de um aumento na concentração de cálcio citoplasmático para deflagrar sua contração, como na presença de agentes vasoconstritores que se ligam a receptores específicos (agonistas α_1 adrenérgico: fenilefrina e noradrenalina) (HOROWITZ *et al.*, 1996).

No presente estudo avaliamos se a técnica de ovariectomia aumenta a resposta contrátil à fenilefrina em vasos de condutância e resistência. Observamos então, que a resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratas do grupo ovx revelou aumento da contração vascular, confirmada pelo aumento da resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) à Fe. No entanto, não foram observadas alterações da reatividade vascular à Fe em artérias mesentéricas entre ratas sham e ovx.

Trabalhos evidenciam a influência do estrogênio sobre a reatividade vascular em anéis de aorta em ratas Ovx (BOLEGO *et al.*, 1997; FLORIAN *et al.*, 2004; STICE *et al.*, 2009 FENOY *et al.*, 2010) como no estudo de Bianchi e colaboradores (2006), onde foi encontrada uma maior reatividade à fenilefrina em anéis de aorta isolados em fêmeas Ovx.

No entanto, nosso estudo demonstrou que o tratamento com espironolactona foi capaz de reverter o aumento de reatividade à Fe em aorta isolada do grupo ovx.. Em acordo com nossos dados, onde não evidenciamos alterações de reatividade em artérias mesentéricas, trabalho desenvolvido por Song e colaboradores em 2006, mostraram que a contração induzida pela fenilefrina não alterou a resposta em ratas sham quando comparada a rata ovariectomizadas por 8 semanas.

Com intuito de verificar se as alterações de reatividade encontradas em aorta isolada de ratas ovx são dependentes ou não do endotélio, protocolos onde o mesmo foi removido mecanicamente foram, então, realizados. Assim foi observado um aumento da resposta máxima a Fe no grupo sham, e no grupo ovx houve diferença apenas na sensibilidade à Fe.

Estes resultados sugerem que a habilidade do endotélio em modular a resposta contrátil induzida à fenilefrina está reduzida em aorta isolada de ovx, mostrando que a deficiência de estrogênio altera a resposta contrátil em anéis de aorta, reduzindo a modulação endotelial.

Estudos recentes como o de Costa e colaboradores em 2015, mostraram que a ausência do endotélio promoveu aumento significativo da $R_{m\acute{a}x}$ à fenilefrina em ratas sham, corroborando com nossos estudos.

Nossos resultados mostram, ainda, que em ratas tratadas com espironolactona, houve um maior deslocamento das curvas concentração-resposta à Fe na ausência do endotélio em ambos os grupos, sugerindo que o bloqueio de receptores de mineralocorticóides melhora a modulação endotelial.

Juntos, os resultados apresentados até o momento sugerem que a deficiência de estrogênio promove aumento da liberação de fatores constrictores e/ou redução de fatores vasodilatadores liberados pelo endotélio em aorta isolada de ratas ovx. Ainda, nossos resultados demonstram que o bloqueio de receptores de mineralocorticóides parece reverter esses efeitos.

Sabendo que o tratamento com espironolactona melhora a função endotelial, foi investigada a resposta vasodilatadora dependente do endotélio por meio de curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis pré-contraídos com fenilefrina.

6.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM ESPIRONOLACTONA SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE E INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO

A acetilcolina liga-se ao receptor muscarínico (M2) levando ao aumento da concentração intracelular de cálcio, o qual ativa a formação e liberação de NO pela ação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). O NO se difunde para o músculo liso vascular, ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) promovendo o aumento da concentração intracelular de GMPc. O GMPc ativa a proteína quinase G (PKG) que fosforila diversas proteínas, reduzindo a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, culminando com o relaxamento do vaso por hiperpolarização do músculo liso vascular (RATTMMAN, 2009).

Afim de comprovar se o bloqueio de MR melhora uma possível redução do relaxamento dependente do endotélio realizamos curvas concentração resposta a ACh em anéis de aorta e mesentérica em ratas sham e ovx.

Qiao e colaboradores em 2008 mostraram que o estrogênio tem ação direta em células vasculares e endotélio, tendo um papel vasorelaxante. O efeito desse hormônio sobre a parede do vaso por ocorrer por uma ação rápida conhecida como mecanismo não genômico, envolvendo componentes da membrana celular, com alteração na permeabilidade iônica e ativação enzimática por uma ação conhecida como mecanismo genômico, o qual envolve ativação de seus receptores intracelulares (PEDROSA, 2009). Os efeitos cardiovascular do estrogênio são bem conhecidas e contribuem para a manutenção de um efeito vasodilatador, antitrombótico e anti-inflamatório do endotélio (HASSAN & WAHHAB, 2012).

No entanto, em nosso estudo não observamos alterações no relaxamento à ACh entre os grupos ovx e sham. Porém, o bloqueio de receptores de mineralocorticoides promoveu aumento do relaxamento no grupo ovx quando comparado ao sham, em aorta isolada.

Nawate e colaboradores em 2005, em um dos seus estudos investigaram o relaxamento dependente do endotélio em artéria mesentérica superior de ratas controle (sham) e ovariectomizadas, não havendo também diferença na resposta a Ach.

Estudos recentes mostram a atenuação de vasodilatadores dependentes do endotélio, e sugerem que essa atenuação possa estar associado com o aumento do risco de complicações cardiovasculares (LEUNG *et al.*, 2016; CALIMAN *et al.*, 2013). Esses dados mostraram que as células endoteliais são capazes de controlar ativamente a homeostase, o remodelamento vascular, a coagulação e as respostas inflamatória e imune (FÉLÉTOU & VANHOUTTE, 2009)

Para avaliar se a deficiência de estrogênio causa prejuízo no relaxamento do músculo liso vascular, foram realizados experimentos com o nitroprussiato de sódio (NPS).

Nossos resultados demonstraram que em ratas ovx, o relaxamento induzido pelo NPS não foi alterado, quando comparado ao sham, tanto em aorta quando em mesentérica. Além disso o bloqueio do MR não induziu qualquer ação nas artérias estudadas. Esses dados demonstram que o ovx não apresenta alteração do relaxamento independente do endotélio, tanto em artéria de condutância e resistência.

Semelhante ao nosso achado, Yung e colaboradores 2011, fez o comparativo de ratas com 4, 8 e 12 semanas de ovariectomia e em nenhum dos grupos houve alteração na resposta ao NPS. Em contrapartida, Oliveira e colaboradores em 2014, compararam ratas sham, ovx e um grupo tratado com metformina. 35 dias após o procedimento cirúrgico, os pesquisadores notaram

diferença significativa ao NPS entre os grupos sham e ovx. Essa resposta pode sugerir que a resposta independente do endotélio pode ser alterada dependente do tempo submetido à ovariectomia.

Os mecanismos pelo qual a deficiência de estrogênio altera a reatividade vascular à fenilefrina foi investigado no presente estudo. Neste sentido, investigamos se as possíveis vias de liberação de fatores relaxantes e/ou contráteis endoteliais alteradas pela ovariectomia, poderiam ser restauradas com o tratamento da espironolactona em anéis de aorta e mesentérica.

6.5 FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NA OVX E O TRATAMENTO COM ESPIRONOLACTONA SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA

6.5.1 Participação da Via do Óxido nítrico em Anéis de Aorta e Mesentéricas de Ratas

Entre os fatores vasodilatadores derivados do endotélio, o NO se destaca pelo seu potente efeito vasodilatador e ações que resultam em manutenção do tônus vascular, inibição da adesão, agregação plaquetária e regulação do crescimento vascular (CANNON, 1998; MONCADA *et al.*, 1991). Sua síntese é estimulada por alguns fatores, como pelas forças de cisalhamento produzidas pelo fluxo sanguíneo no vaso (*shear stress*) e receptores endoteliais (Ex: muscarínico, receptor para bradicinina, etc..) (PALMER *et al.*, 1987).

A produção de NO ocorre a partir da metabolização do aminoácido L-arginina em NO e L-citrulina, por meio da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), na presença de oxigênio, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), tetrahidrobiopterina (BH₄), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) (ANGUS & COCKS, 1989; MICHEL & VANHOUTTE, 2010).

Para investigar se a modulação do NO nas respostas contráteis a fenilefrina estavam alteradas, utilizamos o inibidor de sintase do óxido nítrico, L-NAME. De forma semelhante com o que ocorreu na retirada do endotélio, podemos

relatar que a incubação da artéria aorta com o L-NAME produziu um aumento da resposta contrátil à fenilefrina no grupo controle semelhante com o aumento da resposta no grupo ovx.

Estes resultados sugerem que a redução dos níveis de estrogênio, cursa com a redução da biodisponibilidade de óxido nítrico, e o inverso ocorre nas ratas tratadas com espironolactona, onde percebemos a melhora da disponibilidade de NO, consequentemente melhorando a resposta vascular.

Semelhante ao que encontramos em aorta, a incubação das artérias mesentéricas com L-NAME levou uma diferença apenas na sensibilidade no grupo ovx.

Com esses dados podemos observar que a redução dos níveis de estrogênio é bem relacionado com prejuízo na reatividade vascular devido a redução de fatores vasodilatadores como a redução da biodisponibilidade de NO. (PINNA *et al.*, 2008; CAMPOREZ *et al.*, 2011).

Resultados similares aos nossos foram encontrados no estudo de LEUNG e colaboradores 2016, onde alterações na biodisponibilidade do NO têm sido evidenciado em estudos experimentais com fêmeas ovariectomizadas. Ambos os estudos com animais ou humanos mostraram a redução da função ovariana associada com a redução da produção de NO (GANZ P, 2002).

Os resultados até agora apresentados sugerem que além do óxido nítrico, outras vias podem estar envolvidas nos efeitos deletérios no vaso.

Estudos sugerem que a produção de ROS durante a deficiência de estrogênio pode levar a uma disfunção endotelial (YUNG *et al.*, 2011; VIRDIS *et al.*, 2000). Diante disso, decidimos investigar com maiores detalhes a via dos radicais livres que poderiam elucidar e/ou ratificar os dados encontrados até o momento, uma vez que o NO pode ser reduzido consideravelmente pela sua reação com espécies reativas de oxigênio.

6.5.2 O Papel das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) na Reatividade Vascular em Artérias Aortas e Mesentéricas de Ratas

As EROs são moléculas derivadas do metabolismo do oxigênio formadas por elétrons livres ou não pareados, o que as conferem grande capacidade reativa. A fim de captar um elétron para sua estabilização, as EROs são capazes de reagir com qualquer composto próximo, seja este uma molécula, célula, ou tecido, sendo então denominadas substâncias oxidantes (HARRISON & GONGORA, 2009). As principais EROs são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila (OH^{\bullet}), o peroxinitrito ($OONO^{\bullet}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KOH *et al.*, 2009).

Afim de avaliar a participação do $O_2^{\bullet-}$ no aumento da reatividade à fenilefrina devido a redução dos níveis de estrogênio em aorta, foi utilizado tiron, um “varredor” não-enzimático de ânion superóxido. Após a incubação do tiron, observou-se maior redução na resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis isolados de aorta das ratas ovx, não havendo nenhuma diferença em artérias de resistência.

Assim, observa-se que a perda de estrogênio endógeno leva à redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) derivado do endotélio e prejudica a função endotelial devido aumento de ROS (HERNÁNDEZ *et al.*, 2000).e NO

Um aumento de $O_2^{\bullet-}$ um importante EROS, ocorre concomitantemente com diminuição da biodisponibilidade do NO. O superóxido reage rapidamente com o NO, formando peroxinitrito e diminuindo a biodisponibilidade de NO (RUBANYI; VANHOUTTE, 1986).

Adicionalmente, os resultados obtidos pela técnica de fluorescência emitida por dihidroetídio apresentou aumento na produção local de $O_2^{\bullet-}$ nos anéis de aorta ovx quando comparados as ratas sham, e esse efeito reduziu mais ainda quando usou um bloqueador de MR, confirmando os resultados funcionais do presente estudo.

Uma fonte vascular de $O_2^{\bullet-}$ bem estabelecida é a NADPH oxidase (GRIENDLING; SORESCU; USHIO-FUKAI, 2000; HARRINSON DG, 2009). Hamilton e colaboradores em 2002, demonstraram que a apocinina seria um inibidor da NADPH oxidase, sendo assim com maior potencial para reduzir a produção de $O_2^{\bullet-}$. Porém, alguns autores têm relatado diferentes ações da apocinina que são independentes da sua capacidade de inibir a NADPH oxidase (HEUMÜLLER *et al.*, 2008; RIGANTI *et al.*, 2008), ou seja, ela pode reduzir a disponibilidade de EROs através de suas propriedades antioxidantes (HEUMÜLLER *et al.*, 2008).

No nosso estudo, ocorreu redução da resposta à fenilefrina em todos os grupos na presença de apocinina, porém quando comparamos a curva controle (ausência de inibidor) com as curvas obtidas na presença do inibidor, respectivo de cada grupo, os animais ovx apresentaram uma redução mais significativa a resposta à fenilefrina, indicando que neste grupo há maior produção de EROS.

Este efeito pode estar relacionado à ação da apocinina sobre a NADPH oxidase, impedindo a formação de $O_2^{\bullet-}$ por esta via, e, assim, aumentando a biodisponibilidade do NO (YUNG *et al.*, 2011).

Yung e colaboradores em 2011 demonstraram que a produção de EROs durante a privação de estrogênio pode levar a o desenvolvimento de disfunção endotelial em anéis de aorta. Em um estudo realizado em camundongos fêmeas, a ovariectomia resultou em aumento da produção $O_2^{\bullet-}$ estimulada pela NADPH em aorta. (WASSMANN *et al.*, 2005)

Para confirmar a maior participação da NADPH oxidase no aumento da produção de EROs em artéria aorta, a expressão proteica da gp91phox e NOX4, isoformas da NADPH oxidase, foram quantificada também pela técnica de Western Blot. Esta se apresentou aumentada em artéria aorta de ratas ovx quando comparada aos animais sham, corroborando com os resultados funcionais aqui apresentados.

Outro possível mecanismo que justificaria as alterações vasculares seria a redução das defesas antioxidantes, pois iria contribuir para aumentar a produção de superóxido. Assim, de acordo com os resultados obtidos no western blot, percebemos que a expressão proteica de SOD-Mn está aumentada em artérias aorta de animais com deficiência de estrogênio.

Sugere-se que o estrogênio pode modular a atividade e/ou expressão de enzimas anti e pró oxidantes. Além disso, Leung 2011 mencionou que o estrogênio em concentrações fisiológicas pode reduzir a expressão da enzima NADPH oxidase, principal geradora de EROs em vasos sanguíneos.

Assim sendo, os resultados na ovx com os bloqueadores de MR foram capaz de restaurar a nível de sham quando incubados com apocinina.

Nas artérias mesentéricas a apocinina não alterou a reatividade vascular, o que sugere pouca participação da NADPH oxidase na produção de ânion superóxido neste leito vascular.

Para avaliar a participação do peróxido de hidrogênio utilizamos a catalase, que quando adicionada alterou a reatividade vascular em anéis de aorta. Levando em consideração esta informação, esta análise revelou que a produção de EROs nas ratas ovx estavam aumentada em comparação com os valores do grupo sham.

Estudos em fêmeas SHR ovariectomizadas também mostraram que a incubação com catalase reduz os níveis de ROS em vasos de aorta. (CERAVOLO et al. 2012). Portanto a catalase, SOD e outros compostos formam o sistema de defesa anti-oxidativo que regula as concentrações de ROS, dentro de níveis homeostáticos não tóxicos (HALLIWELL, 2007)

Nosso próximo passo foi investigar a via dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase pois o envolvimento dessa via também poderia explicar a redução de NO (MARNETT *et al* 1999), assim aumentando a resposta contrátil à fenilefrina nos anéis de aorta e mesentérica.

6.5.3 O Papel dos Prostanóides Derivados da Ciclooxygenase (cox) sobre a Reatividade Vascular em Artérias Aortas e Mesentéricas de Ratas

Os prostanóides derivados da via da ciclooxygenase desempenham um importante papel na regulação do tônus vascular e participam das respostas à agressão vascular (ALVAREZ *et al.*, 2005).

Para avaliar se os prostanóides vasoconstritores estão envolvidos no aumento da reatividade vascular à fenilefrina induzido pela redução dos níveis de estrogênio, foi utilizada indometacina, um inibidor não seletivo das ciclooxygenases.

Esse inibidor reduziu significativamente a reatividade vascular à fenilefrina nos segmentos aórticos de ratas sham e ovx, porém esse efeito foi maior em ratas OVX, sugerindo maior liberação de prostanóides constritores neste grupo.

Esse aumento de constritores em vasos de condutância pode ser justificado também pelo aumento de ROS. Assim, uma vez que houve aumento de ROS no grupo ovx, há possibilidade de aumento de prostanóides.

Concomitantemente, Caramari & Zago 2000 mostraram que o aumento dos produtos da via da COX-2 induzidos pela ovariectomia, podem aumentar a produção de EROs. Esse aumento acarreta em estresse oxidativo que pode culminar em aumento da reatividade vascular e disfunção endotelial. Assim, nossos resultados sugerem que o aumento de produtos derivados da cox, possivelmente COX-2, induzidos pela ovx, poderiam estar relacionados com o aumento de ROS (ou vice-versa). De fato, estudos mostram que os produtos derivados da COX-2 podem modular a produção de EROs (MARTÍNEZ-REVELLES *et al.*, 2013).

O tratamento com espironolactona na aorta, não altera a resposta no grupo sham, ou seja, continua ocorrendo aumento de prostanóides, já na ovx essa resposta é restaurada na presença de bloqueador de MR.

Em outro modelo experimental usando aorta de ratos diabéticos Adel e colaboradores em 2014, mostrou os efeitos benéficos do bloqueador MR, espironolactona, que reduziu o estresse oxidativo nos ratos diabéticos, assim esse estudo mostra que o fármaco é capaz de diminuir a formação de superóxido e assim melhorando a biodisponibilidade de NO.

Ao analisarmos o envolvimento de prostanóides nas respostas vasoconstritoras em artérias de resistência, vimos uma produção de prostanóides constritores apenas no grupo sham, mostrando uma redução significativa na resposta induzida por fenilefrina resultante do bloqueio dos prostanóides com indometacina, mostrando uma pequena participação desta via nos vasos de resistência.

Posteriormente esse aumento de prostanóides do grupo sham foi abolido na presença de bloqueadores de MR, sugerindo que esse fármaco pode ter ação na redução de produção de prostanóides constritores.

6.6 EFEITO DO TRATAMENTO COM ESPIRONOLACTONA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO PLASMÁTICO

O processo de peroxidação lipídica consiste em uma cascata de reações resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares e lipoproteínas, transformando-os em ácidos graxos peroxidados os quais sofrem redução de sua cadeia lateral liberando malondialdeído (MDA), de maneira que sua concentração sérica é proporcional à quantidade de ácidos graxos poliinsaturados oxidados. Este processo acarreta em destruição de sua estrutura, falências dos mecanismos de troca de metabólitos e, em condição extrema, morte celular (BENZIE, 1996).

Sabendo que a peroxidação lipídica é frequentemente associada ao aumento das EROs, o presente estudo avaliou a disfunção endotelial devido ovx sobre os níveis de MDA no plasma.

Os resultados encontrados, após a ovx mostraram que o aumento dos níveis de MDA no plasma pode sugerir que a falta de estrogênio levou efeitos deletérios, porém isso foi melhorado na presença de bloqueador MR.

Corroborando com nossos dados Faustino e colaboradores em 2013, analisaram os níveis de MDA no plasma de ratas ovx, e percebeu que não houve diferença significativa entre os grupos sham e ovx.

Portanto, embora a ovariectomia altere as funções vasculares culminando em disfunção endotelial, o processo de peroxidação lipídica melhora na presença de bloqueadores de MR.

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que a deficiência de estrogênio induziu alteração na reatividade vascular em aorta, mas não em artérias mesentérica de resistência, com aumento da resposta vasoconstritora e redução da resposta vasodilatadora dependente do endotélio. Estas alterações da função vascular parecem ser promovidas pela redução da biodisponibilidade do NO, pelo aumento da produção de $O_2^{\bullet-}$ em aortas; e ainda sugere uma possível participação dos prostanóides em artérias de condutância. Todas as alterações vasculares observadas em aorta isolada foram normalizadas pelo tratamento com bloqueador de receptor mineralcorticóide, a um nível semelhante aos animais do grupo sham.

Podemos especular que, caso a espironolactona seja usada numa fase precoce de deficiência estrogênica, essa droga exerça um efeito protetor sobre a função endotelial, assim como exercem importante controle sobre a redução da peroxidação lipídica alteradas em ratas com deficiência estrogênica.

Portanto, o nosso estudo demonstrou que a influência do bloqueador de receptores mineralcorticóide em vasos de condutância pode trazer efeitos benéficos, podendo assim contribuir para prevenção de uma possível disfunção vascular em mulheres na fase pós-menopausa.

8. REFERÊNCIAS

AKKI A, ZHANG M, MURDOCH C, BREWER A, SHAH AM (2009) NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function. *J Mol Cell Cardiol* 47: 15–22. S0022- 2828(09)00152-7 [pii];10.1016/j.yjmcc.2009.04.004

ALVARÉZ Y, BRIONES AM, BALFAGÓN G, ALONSO MJ, SALACEIS M. Hypertension Increase the Participation of Vasoconstrictor Prostanoids from Cyclooxygenase-2 in Phenylephrine Responses. *Journal os Hypertension* 2005; 23(4):767-777.

ANGUS, J.A., COCKS, T.M., 1989. Endothelium-Derived Relaxing Factor *Pharmacol Ther.* 41, 303–52.

ARMANDO, M. JEZOVA, A. V. JUORIO et al., “Estrogen upregulates renal angiotensin II AT2 receptors,” *The American Journal ofPhysiology—Renal Physiology*, vol. 283, no. 5, pp. F934–F943, 2002.

AUCH-SCHWELK W, KATUSIC ZS, VANHOUTTE PM. Contractions to Oxygen-Derived Free Radicals are Augmented in Aorta of the Spontaneously Hypertensive Rat. *Hypertension*. 1989 Jun;13(6 Pt 2):859-64.

AYE & MOHAMED M. A. KHALIFA. Spironolactone Improves Endothelial Dysfunction in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Heba Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2014) 387:1187–1197

BALDO MP, ZANIQUELI D, FORECHI L, MACHADO RC, RODRIGUES SL, MILL JG: Effect of Spironolactone in Adult Spontaneously Hypertensive Rats Submitted to High Salt Intake. *Clinics*, 2011, 66, 477–482.

BATLOUNI,M. Endotélio e Hipertensão Arterial. *Rev Bras Hipertens* 8: 328-38, 2001.

BECHLIOULIS A, NAKA KK, KALANTARIDOU SN, CHATZIKYRIAKIDOU A, PAPANIKOLAOU O, KAPONISE A, K VAKALIS, VEZYRAKIF P, GARTZONIKAG K, MAVRIDISG A, GEORGIOUD I, MICHALIS LK. Short-term hormone therapy improves sCD40L and endothelial function in early menopausal women: potential role of estrogen receptor polymorphisms. *Maturitas* 2012;71(4):389-95.

BENZIE, I.F., 1996. Lipid Peroxidation: a Review of Causes, Consequences, Measurement and Dietary Influences. *Int J Food Sci Nutr.* 47, 233–261.

BIANCHI PR, GUMZ BP, GIUBERTI K, STEFANON I. Myocardial Infarction Increase Reactivity to Phenylephrine in Isolated Aortic Rings os Ovariectomized Rats. *Life Sciences.*, v. 78, P. 875–881, 2006.

BOLEGO C, CIGNARELLA A, RUZZA R, ZAAROUR C, MESSI E, ZANISI M, P.L Differential Effects of Low- and High Dose Estrogen Treatments on Vascular Responses in Female Rats. *Life Sciences*, v.25, N.60, p. 2291-2302,1997.

BONETTI PO, LERMAN LO, LERMAN A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 168-175.

BRIONES,A.M.,NGUYENDINH CAT,A.,CALLERA,G.E.,YOGI,A.,BURGER,D., HE,Y.,et al.(2012). Adipocytes produce aldosterone through calcineurin-dependent signaling pathways:implications in diabetes mellitus-associated obesity and vascular dysfunction. *Hypertension* 59,1069–1078.doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.190223

BROWN,N.J.(2013).Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis. *Nat.Rev.Nephrol.* 9,459–469.doi: 10.1038/nrneph.2013.110

BRUDER-NASCIMENTO,T.,DASILVA,M.A., AND TOSTES,R.C.(2014). The involvement of aldosterone on vascular insulin resistance: implications in

obesity and type 2 diabetes. *Diabetol.Metab.Syndr.* 6:90.doi:10.1186/1758-5996-6-90

CALIMAN, I. F. Et al. Endothelial Relaxation Mechanisms and Oxidative Stress are Restored by Atorvastatin Therapy in Ovariectomized Rats. *Plos one*, v. 8, n. 11, p. E80892, jan. 2013.

CALLERA,G.E.,TOUYZ,R.M.,TOSTES,R.C.,YOGI,A.,HE,Y.,MALKINSON,S.,et al.(2005).Aldosterone activates vascular p38 MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. *Hypertension* 45,773–779.doi:10.1161/01.HYP.0000154365.30593.d3

CALLERA,G.E.,YOGI,A.,BRIONES,A.M.,MONTEZANO,A.C.,HE,Y.,TOSTES,R. C.,et al. (2011).Vascular proinflammatoryresponses by aldosteronea remediated via c- Src trafficking to cholesterol-rich microdomains: role of PDGFR. *Cardiovasc. Res.* 91,720–731.doi:10.1093/cvr/cvr131

CAMPOREZ, J. P. G. et al. Dehydroepiandrosterone Protects Against Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction in Ovariectomized Rats. *The Journal of physiology*, v. 589, n. Pt 10, p. 2585–96, 15 maio 2011.

CANNON III RO. Role of Nitric Oxide in Cardiovascular Disease: Focus on The Endothelium. *Clinical Chemistry* 1998; 44(8): 1809-1819

CARAMORI, P.R.A., ZAGO, A.J., 2000. Disfunção Endotelial e Doença Arterial Coronariana. *Arq. Bras. Cardiol.* 75, 163–172.

CERAVOLO GS, FILGUEIRA FP, COSTA TJ, LOBATO NS, CHIGNALIA AZ, ARAUJO PX, TOSTES RC, DANTAS AP, FORTES ZB, CARVALHO MH. Conjugated Equine Estrogen Treatment Corrected the Exacerbated Aorta Oxidative Stress in Ovariectomized Spontaneously Hypertensive Rats. *Steroids*. 2013 Mar;78(3):341-6. doi: 10.1016/j.steroids.2012.11.018. Epub 2012 Dec 19.

CHAMBLISS KL AND SHAUL PW (2002) Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev* 23:665–686.

CHAPMAN N, DOBSON J, WILSON S, et al. Effect of spironolactone on blood pressure in subjects with resistant hypertension. *Hypertension*. 2007;49:839–845.

COSTA TJ, CERAVOLO GS, DOS SANTOS RA, DE OLIVEIRA MA, ARAUJO PX, GIAQUINTO LR, TOSTES RC, AKAMINE EH, FORTES ZB, DANTAS AP, CARVALHO MH. Association of Testosterone with Estrogen Abolished the Beneficial Effects of Estrogen treatment by Increasing ROS Generation in Aorta Endothelial Cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015 Apr 1;308(7):H723-32.doi:10.1152/ajpheart.00681.2014. Epub 2015 Jan 30

CRAMER DW, XU H, HARLOW BL. Does incessant ovulation increase risk for early menopause? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1995;172(2):568-573.

DAVIDGE S. T. Prostaglandin H Synthase and Vascular Function. *Circ Res*. 2001;89:650-660.)

DE MEDEIROS, A. R. S. et al. Tibolone has Anti-inflammatory Effects in Estrogen-Deficient Female Rats on the Natriuretic Peptide System and TNF-Alpha. *Regulatory peptides*, v. 179, n. 1-3, p. 55–60, 10 nov. 2012.

DICKINSON KM, KEOGH JB, CLIFTON PM. Effects of a low-salt diet on flow-mediated dilatation in humans. *Am J Clin Nutr*. 2009; 89: 485–90

DRUMMOND GR, SELEMIDIS S, GRIENDLING KK, SOBEY CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Jun;10(6):453-71. doi: 10.1038/nrd3403

DUBEY, R. K. et al. Vascular consequences of menopause and hormone therapy: importance of timing of treatment and type of estrogen. *Cardiovascular research*, v. 66, n. 2, p. 295–306, 1 maio 2005.

DÜSING, R. (2016) Mega clinical trials that have shaped the RAS intervention clinical practice. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 10. In press.

FARQUHARSON, C.A., AND STRUTHERS, A.D. (2000). Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin I/angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure. *Circulation* 101, 594–597. doi:10.1161/01.CIR.101.6.594

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. EDHF: an update. *Clinical science (London, 73 England : 1979)*, v. 117, n. 4, p. 139–155.

FELS, J., OBERLEITHNER, H., AND KUSCHE-VIHROG, K. (2010). Menage a trois: aldosterone, sodium and nitric oxide in vascular endothelium. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 1193–1202. doi:10.1016/j.bbadis.2010.03.006

FENOY FJ, HERNANDEZ ME, HERNANDEZ M, QUESADA T, SALOM MG, H. I. Acute Effects of 2-Methoxyestradiol on Endothelial Aortic NO Release in Male and Ovariectomized Female Rats. *Nitric Oxide*, v. 23, n. 1, p. 12–19, 2010.

FLORIAN, M.; FREIMAN, A.; MAGDER, S. Treatment with 17-Beta- Estradiol Reduces Superoxide Production in Aorta of Ovariectomized Rats. *Steroides*, v. 69, N. 13-14, P. 779–87, DEZ. 2004.

FÖRSTERMANN, U., AND MÜNZEL, T. (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113, 1708–1714. doi: 10.1161/Circulation a ha.105.602532

FRESHOUR JR, CHASE SE, VIKSTROM KL (2002) Gender differences in cardiac ACE expression are normalized in androgen-deprived male mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1997–H2003. 10.1152/ajpheart.01054.2001.

FRÖLICH, J. C.; FÖRSTERMANN, U. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. *Advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene research*, v. 19, p. 211–5, 1989.

FUNK .Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science*, 294:1871-1875; 2001

FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980 Nov 27;288(5789):373-6.

GALLAGHER PE, Li P, LENHART JR, CHAPPELL MC, BROSNIHAN KB (1999) Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension* 33: 323–328.

GANZ P (2002). Vasomotor and Vascular Effects of Hormone Replacement Therapy. *Am J Cardiol* 90:11F–16F.

GRIENDLING KK, SORESCU D, USHIO-FUKAI M. NAD(P)H Oxidase: Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Circ Res* 2000; 86: 494-501.

GRODSTEIN F., MANSON J. E., COLDITZ G. A., WILLETT W. C., SPEIZER F. E., AND STAMPFER , “A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease,” *Annals of Internal Medicine*, vol. 133, no. 12, pp. 933–941, 2000.

GUETTA V, QUYYUMI AA, PRASAD A, PANZA JA, WACLAWIW M, CANNON RO III. The role of nitric oxide in coronary vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation* 1997;96:2795-801.

GUSTAFSSON, J.A., 2003. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 479–485. doi:10.1016/S0165-6147(03)00229-3

HAKIM,T.S.,SUGIMORI,K.,CAMPORESI,E.M.,ANDANDERSON,G.(1996).Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without hemoglobin. *Physiol.Meas.* 17,267–277.doi:10.1088/0967-3334/17/4/004

HAYNES MP, LI L, SINHA D, RUSSELL KS, HISAMOTO K, BARON R, COLLINGE M, SESSA WC, AND BENDER JR (2003) Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *J Biol Chem* 278:2118–2123.

HAYNES MP, SINHA D, RUSSELL KS, COLLINGE M, FULTON D, MORALES-RUIZ M, SESSA WC, AND BENDER JR (2000) Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res* 87:677–682.

HALLIWELL B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2007;35: 1147–50.

HAMMES SR & LEVIN ER. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocrine Reviews* 2007;28(7):726–41.

HAMILTON CA, BROSNAM MJ, AL-BENNA S, BERG G, DOMINICZACK AF. NAD(P)H Oxidase Inhibition Improves Endothelial Function in Rat and Human Blood Vessels. *Hypertension*. 2002; 40: 755-762.

HARLOW BL & SIGNORELLO LB. Factors associated with early menopause. *Maturitas* 2000

HARRINSON DG, GONGORA MC. Oxidative Stress and Hypertension. *The Medical Clinics of North America* 2009; 93: 621-635.

HASSAN HA, ABDEL-WAHHAB MA. Effect of Soybean Oil on Atherogenic Metabolic Risks Associated With Estrogen Deficiency in Ovariectomized Rats: Dietary Soybean Oil Modulate Atherogenic Risks in Ovariectomized

Rats. *J Physiol Biochem.* 2012 Jun;68 (2):247-53. DOI: 10.1007/s13105-011-0137-8. EPUB 2011 DEC 29.

HAWKINS, M.B., THOMAS, P., 2004. The unusual binding properties of the third distinct teleost estrogen receptor subtype ERbeta are accompanied by highly conserved amino acid changes in the ligand binding domain. *Endocrinology* 145, 2968–77. doi:10.1210/en.2003-0806

HAYNES MP, LI L, SINHA D, RUSSELL KS, HISAMOTO K, BARON R, COLLINGE M, SESSA WC, AND BENDER JR (2003) Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *J Biol Chem* 278:2118–2123.

HAYNES MP, SINHA D, RUSSELL KS, COLLINGE M, FULTON D, MORALES-RUIZ M, SESSA WC, AND BENDER JR (2000) Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res* 87:677–682.

HERNÁNDEZ, I. ET AL. 17Beta-Estradiol Prevents Oxidative Stress and Decreases Blood Pressure in Ovariectomized Rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 279, n. 5, p. R1599– 605, nov.2002

HEUMÜLLER S, WIND S, BARBOSA-SICARD E, SCHMIDT HH, BUSS R, SCHRÖDER K, BRANDES RP. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension* 2008; 51: 211–217..

HOLLENBERG, N.K., STEVANOVIC, R., AGARWAL, A., LANSANG, M.C., PRICE, D. A., LAFFEL, L.M., et al. (2004). Plasma aldosterone concentration in the patient with diabetes mellitus. *Kidney Int.* 65, 1435–1439. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00524.

HOROWITZ, A., MENICE, C.B., LAPORTE, R., MORGAN, K.G., 1996. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev.* 76, 967–1003.

JABLONSKI KL, RACINE ML, GEOLFOS CJ, GATES PE, CHONCHOL M, McQUEEN MB, et al. Dietary sodium restriction reverses vascular endothelial dysfunction in middle-aged/older adults with moderately elevated systolic blood pressure. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 61(3): 335–343.

KATSU, Y., LANGE, A., MIYAGAWA, S., URUSHITANI, H., TATARAZAKO, N., KAWASHIMA, Y., TYLER, C.R., IGUCHI, T., 2013. Cloning, expression and functional characterization of carp, *cyprinus carpio*, estrogen receptors and their differential activations by estrogens. *J. Appl. Toxicol.* 33, 41–49. doi:10.1002/jat

KIFOR I, DZAU VJ. Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circ Res.* 1987 Mar;60(3):422-8.

KLEINERT H, WALLERATH T, EUCHENHOFER C, IHRIG-BIEDERT I, LI H, FÖRSTERMANN U. Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved. *Hypertension.* 1998 Feb;31(2):582-8.

KLOOSTERBOER, H. J.; EDERVEEN, A. G. H. Pros and Cons of Existing Treatment Modalities in Osteoporosis: A Comparison Between Tibolone, Serms and Estrogen (+/-Progestogen) Treatments. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, v. 83, N. 1-5, P. 157–65, DEZ. 2002

KOH KK, OH PC, WUON MJ. Does Reversal of Oxidative Stress and Inflammation Provide Vascular Protection? *Cardiovascular Research* 2009; 81: 649-659.

KORNEL L. Colocalization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and mineralocorticoid receptors in cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens.* 1994 Jan;7(1):100

LABUZEK,K.,LIBER,S.,BULDAK,L.,KRUPEJKEDZIERSKA,J.,MACHNIK,G.,BO
BRZYK, M.,et al.(2014).Eplerenone mimics features of the alternative activation
in macrophages obtained from patients with heart failure and healthy
volunteers. Eur.J.Pharmacol. 726,96–108.doi:10.1016/j.ejphar.2014.01.043

LEUNG FP, YUNG LM, NGAI CY, CHEANG WS, TIAN XY, LAU CW, ZHANG
Y, LIU J, CHEN ZY, BIAN ZX, YAO X, HUANG Y. Chronic black tea extract
consumption improves endothelial function in ovariectomized rats. Eur J Nutr
DOI 10.1007/s00394-015-1012-0

LEVENS NR, DE GASPARO M, WOOD JM, BOTTARI SP. Could the
pharmacological differences observed between angiotensin II antagonists and
inhibitors of angiotensin converting enzyme be clinically beneficial? Pharmacol
Toxicol. 1992 Oct;71(4):241-9

LEVY DG, ROCHA R, FUNDER JW. Distinguishing the antihypertensive and
electrolyte effects of eplerenone. J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89:2736–2740.

LINCOLN TM, DEY N, SELLAK H. Invited review: cGMP-dependent protein
kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to
gene expression. *Journal of applied physiology* 2001; 91(3): 1421-1430.

MACRITCHIE AN, JUN SS, CHEN Z, GERMAN Z, YUHANNA IS, SHERMAN
TS, SHAUL PW Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene
expression in fetal pulmonary artery endothelium. Circ
Res. 1997 Sep;81(3):355-62.

MALINSKI,T.,TAHA,Z.,GRUNFELD,S.,PATTON,S.,KAPTURCZAK,M., AND
TOMBOULIAN, P.(1993).Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored
insitu by porphyrin in micro sensors. Biochem.Biophys.Res.Commun.
193,1076–1082. doi:10.1006/bbrc.1993.1735.

MANCIA G, DE BACKER G, DOMINICZAK A, et al. ESH-ESC Task Force on
the Management of Arterial Hypertension. 2007 ESH-ESC Practice Guidelines

for the Management of Arterial Hypertension: ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens* 2007; 25(9): 1751–1762

MARCONDES, F. K., BIANCHI, F. J. and TANNO, A. P. Determination of the Estrous Cycle Phases of Rats: Some Helpful Considerations. *Braz. J. Biol.*, 62(4A): 609-614, 2002

MARNETT LJ, ROWLINSON SW, GOODWIN DC, KALGUTKAR AS, LANZO CA. Arachidonic Acid Oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J Biol Chem.* 1999 Aug 13;274(33):22903-6.

MARON BA, ZHANG YY, WHITE K, et al. Aldosterone inactivates the endothelin-B receptor via a cysteinyl thiol redox switch to decrease pulmonary endothelial nitric oxide levels and modulate pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2012;126:963–974.

MARTÍN-FERNÁNDEZ B, DE LAS HERAS N, MIANA M, BALLESTEROS S, VALERO-MUÑOZ M, VASSALLO D, DAVEL AP, ROSSONI LV, CACHOFEIRO V, LAHERA V. Spironolactone Prevents Alterations Associated With Cardiac Hypertrophy Produced By Isoproterenol in Rats: Involvement of Serum- and Glucocorticoid Regulated Kinase Type 1. *Exp Physiol* 2012 Jun; 97(6):710-8 doi: 10.1113/expphysiol.2011.063230. Epub 2012 Feb 10.

MARTÍNEZ-REVELLES, S., AVENDAÑO, M.S., GARCÍA-REDONDO, A.B., ALVAREZ, Y., AGUADO, A., PÉREZ-GIRÓN, J. V, GARCÍA-REDONDO, L., ESTEBAN, V., REDONDO, J.M., ALONSO, M.J., BRIONES, A.M., SALAICES, M., 2013. Reciprocal Relationship Between Reactive Oxygen Species and Cyclooxygenase-2 and Vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 18, 51–65.

MCCURLEY A, JAFFE IZ. Mineralocorticoid receptors in vascular function and disease. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Mar 24;350(2):256-65. doi: 10.1016/j.mce.2011.06.014. Epub 2011 Jun 24

MICHEL, T., VANHOUTTE, P.M., 2010. Cellular Signaling and NO Production. *Pflugers Arch.* 459, 807–816.

MILL JG, MILANEZ MC, RESENDE MM, GOMES MGS, LEITE CM: Spironolactone prevents cardiac collagen proliferation after myocardial infarction in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2003, 30, 739–744.

MONCADA S. Nitric oxide. *Journal of hypertension*. 1994; 12(10): 35-39.

MONCADA M, PALMER RMJ, HIGGES EA. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. *Pharmacological Reviews* 1991; 43: 109-142.

MULVANY MJ, AALKJAER C. Structure and function of small arteries. *Physiological Reviews* 1990; 70(4): 921-961.

MULVANY MJ, HALPERN W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation Research* 1977; 41 (1): 19-26.

NAGATA,D., TAKAHASHI,M., SAWAI,K., TAGAMI,T., USUI,T., SHIMATSU,A., et al. (2006). Molecular mechanism of the inhibitory effect of aldosterone on endothelial NO synthase activity. *Hypertension* 48,165–171.doi: 10.1161/01.HYP.0000226054.53527.bb

NAWATE S, FUKAO M, SAKUMA I, SOMA T, NAGAI K, TAKIKAWA O.,MIWA S. & KITABATAKE A. Reciprocal changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor- and nitric oxide system in the mesenteric artery of adult female rats following ovariectomy. *British Journal of Pharmacology* (2005) 144, 178–189.

NGUYEN DINH CAT A, JAISSE F. Extrarenal effects of aldosterone. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012;21:147–156.

NICKENIG, G.; BA"UMER, A.T.; GROHE, C.; KAHLERT,S.; STREHLOW, K.; ROSENKRANZ, S.; STA"BLEIN,A.; Estrogen Modulates AT1 Receptor Gene Expression In Vitro and In Vivo. (Circulation. 1998;97:2197-2201.)

OBERLEITHNER,H.,CALLIES,C.,KUSCHEVIHROG,K.,SCHILLERS,H.,SHAHI N,V., RIETHMÜLLER,C.,et al.(2009).Potassiums opens vascular endothelium and increases nitric oxide release. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 106,2829–2834.doi: 10.1073/pnas.0813069106

OLIVEIRA PW, DE SOUZA GJ, CALIMAN IF, LAMAS AZ, SANTOS DE MEDEIROS AR, DE ANDRADE TU, DE ABREU GR, DE FIGUEIREDO SG, BISSOLI NS. Metformin Ameliorates Ovariectomy Induced Vascular Dysfunction in Non Diabetic Wistar Rats. Clin Sci (Lond) 2014 Aug; 127(4):265-75 doi:10.1042/CS 20130553

PALMER, R.M., FERRIGE, A.G., MONCADA, S., 1987. Nitric Oxide Release Accounts for the Biological Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor. Nature. 327, 524–526.

PARAVICINI TM, TOUYZ RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. Diabetes Care. 2008;31(suppl 2):S170–S180.

PEDROSA DF,REZENDE LCD, SILVA IV, RANGEL LBA,GONÇALVES WLS, GRACELI JB, Efeitos Benéficos do Estrogênio no Sistema Vascular.Perspectivaonline volume 3, número 12, 2009.

PEPINE C. J., NICHOLS W. W., AND PAULY D. F., "Estrogen and different aspects of vascular disease in women and men," Circulation Research, vol. 99, no. 5, pp. 459–461, 2006.

PINNA, C. ET AL. Prolonged Ovarian Hormone Deprivation Impairs the Protective Vascular Actions of Estrogen Receptor Alpha Agonists. Hypertension, v. 51, n. 4, p. 1210–7, abr. 2008.

PUJA K. MEHTA AND KATHY K. GRIENDLING. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C82–C97, 2007. First published July 26, 2006; doi:10.1152/ajpcell.00287.2006

RATTMMAN, Y.D., 2009. Mecanismos Endoteliais Envolvidos nos Efeitos Vasculares da *Dicksonia sellowiana* (PRESL.) Hook. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná.

RECKELHOFF JF & FORTEPIANI LA. Novel mechanisms responsible for postmenopausal hypertension. *Hypertension* 2004;43(5):918–23.

RIBEIRO RF JR, POTRATZ FF, PAVAN BMM, FORECHI L, LIMA FLM, et al. (2013) Carvedilol Prevents Ovariectomy-Induced Myocardial Contractile Dysfunction in Female Rat. *PLoS ONE* 8(1): e53226. doi:10.1371/journal.pone.0053226

RICCIOTTI E., FITZGERALD G.A. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:986-1000.

RIGANTI C, COSTAMAGNA C, DOUBLIER S, MIRAGLIA E, POLIMENI M, BOSIA A, GHIGO D. The NADPH Oxidase Inhibitor Apocynin Induces Nitric Oxide Synthesis Via Oxidative Stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 228: 277–285.

ROCCO, T. AND FANG, J. (2006) Farmacoterapia da insuficiencia cardiaca congestiva. In: Hardman, J.(ed), Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11nd edition, Rio de Janeiro: McGraw- Hill Interamericana do Brasil, pp. 679–702.

RUBANYI GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22 Suppl 4:S1-14.

RUBANYI, G. M.; VANHOUTTE, P. M. Superoxide Anions and Hyperoxia Inactivate Endothelium-Derived Relaxing Factor. *The American journal of physiology*, v. 250, n. 5 Pt 2, p. H822–7, maio 1986.

RUBANYI, G.M. AND VANHOUTTE, P.M. (1986). Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 251: H815–H821

RYOU SH, KANG MS, KIM KI, KANG YH, KANG JS. Effects of Green Tea or Sasa Quelpaertensis Bamboo Leaves on Plasma and Liver Lipids, Erythrocyte Na Efflux, and Platelet Aggregation in Ovariectomized Rats. *Nutr Res pract.* 2012 APR;6(2):106-12.

SATO, M. et al. Advantages Of Raloxifene Over Alendronate Or Estrogen On Nonreproductive And Reproductive Tissues In The Long-Term Dosing Of Ovariectomized Rats. *J Pharmacol Exp Ther.*, v. 279, n. 1, p. 298–305, out. 1996.

SCHJERNING J, UHRENHOLT TR, SVENNINGSSEN P, et al. Histamine-dependent prolongation by aldosterone of vasoconstriction in isolated small mesenteric arteries of the mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013; 304:H1094–H1102.

SEALS DR, JABLONSKI KL, DONATO AJ. Aging and vascular endothelial function in humans. *Clin Sci (Lond).* 2011 May;120(9):357-75

SHENOY V, GROBE JL, QI Y, FERREIRA AJ, FRAGA-SILVA RA, et al. (2009) 17beta- Estradiol modulates local cardiac renin-angiotensin system to prevent cardiac remodeling in the DOCA-salt model of hypertension in rats. *Peptides* 30: 2309– 2315. S0196-9781(09)00363-5 [pii];10.1016/j.peptides.2009.09.005

SHUSTER LT, RHODES DJ, GOSTOUT BS, GROSSARDT BR, ROCCA WA. Premature menopause or early menopause: long-term health consequences. *Maturitas* 2010;65(2):161-166.

SMITH, et al. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and-2. *J. Biol. Chem.*, 271: 33157–33160; 1996

SONG D, YUEN VG, YAO L, MC NEILL JH, Chronic Estrogen Treatment Reduces Vasoconstrictor Responses in Insulin Resistant Rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006 Nov; 84(11):1139-43

STICE JP, EISERICH JP, K. A. Role of Aging Versus the Loss of Estrogens in the Reduction in Vascular Function in Female Rats. *Endocrinology*, v. 150, p. 212–219, 2009.

SUMINO H, ICHIKAWA S, OHYAMA Y, NAKAMURA T, KANDA T, et al. (2003) Effects of hormone replacement therapy on serum angiotensin-converting enzyme activity and plasma bradykinin in postmenopausal women according to angiotensin-converting enzyme-genotype. *Hypertens Res* 26: 53–58.

SZASZ T, THAKALI K, FINK GD, WATTS SW. A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2007 Jan;232(1):27-37.

THIRD REPORT OF THE NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. *Circulation* 2002; 106: 3143–3421.

THOM TJ. International mortality from heart disease: rates and trends. *International Journal of Epidemiology* 1989;18:S20–S28.

THOMOPOULOS C, PARATI G, ZANCHETTI A. Effects of blood pressure lowering on outcome incidence in hypertension: 1. Overview, meta-analyses, and metaregression analyses of randomized trials. *J Hypertens.* 2014;32(12):2285-95.

TODA N, NAKANISHI S, TANABE S. Aldosterone affects blood flow and vascular tone regulated by endothelium-derived NO: therapeutic implications. *Br J Pharmacol.* 2013;168:519–533.

TOUYZ,R.M.(2004).Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells—implications in cardiovascular disease. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 37,1263–1273.doi:10.1590/S0100-879X2004000800018

TRIGGLE CR, HOLLENBERG M, ANDERSON TJ, DING H, JIANG Y, CERONI L, WIEHLER WB, ELLA SMN, ELLIS A, ANDREWS K, MCGUIRE JJ, PANNIRSELVAM M. The endothelium in health and disease – A Target for therapeutic intervention. *Journal of Smooth Muscle Research.*2003; 39(6): 249-267.

UHRENHOLT TR, SCHJERNING J, HANSEN PB, et al. Rapid inhibition of vasoconstriction in renal afferent arterioles by aldosterone. *Circ Res.* 2003;93:1258–1266.

VANHOUTTE PM, BOULANGER CM, ILLIANO SC, NAGAO T, VIDAL M, MOMBOULI JV. Endothelium-dependent effects of converting-enzyme inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22 Suppl 5:S10-6.

VELMURUGAN,G.V.,SUNDARESAN,N.R.,GUPTA,M.P.,AND WHITE,C.(2013). Defective Nrf2-dependent redox signalling contributes to microvascular dysfunction in type 2 diabetes. *Cardiovasc.Res.* 100,143–150.doi: 10.1093/cvr/cvt125

VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. *Revista Hipertensão.* v. 13, n. 1, p. 1-68, 2010.

VIRDIS A, GHIADONI L, PINTO S, LOMBARDO M, PETRAGLIA F, GENNAZZANI A, BURALLI S (2000) Mechanisms Responsible for Endothelial Dysfunction Associated with Acute Estrogen Deprivation in Normotensive Women. *Circulation* 101:2258–2263).

VIRDIS,A.,NEVES,M.F.,AMIRI,F.,VIEL,E.,TOUYZ,R.M.,ANDSCHIFFRIN,E.L.(2002). Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. Hypertension 40, 504-510 .doi: 10. 1161/01. HYP. 0000034738. 79310.06

WAGNER AH, SCHROETER MR, HECKER M. 17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. FASEB J. 2001 Oct;15(12):2121-30.

WASSMANN K, WASSMANN S, N. G. Progesterone Antagonizes the Vasoprotective Effect of Estrogen on Antioxidant Enzyme Expression and Function. Circulation research, v. 97, p. 1046–1054, 2005

WASSMANN S, BAUMER AT, STREHLOW K, VAN EICKELS M, GROHE C, AHLBORY K, et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. Circulation 2002; 103:435–441.

WEBER, K. (2001) Cardioreparation in hypertensive heart disease. Hypertension 38: 588–591.

WEINBERGER MH, RONIKE B, KRAUSE SL, WEISS RJ, Et Al. Eplerenone, A Selective Aldosterone Blocker, In Mild-To-Moderate Hypertension. Am J Hypertens. 2002;15:709–716.

WIDLANSKY ME, GOKCE N, KEANEY JF Jr, VITA JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. J Am Coll Cardiol. 2003 Oct 1;42(7):1149-60.

WIGGERS, G. A, PEÇANHA, F.M., BRIONES, A M., PÉREZ-GIRÓN, J. V, MIGUEL, M., VASSALLO, D. V, CACHOFEIRO, V., ALONSO, M.J., SALAICES, M., 2008. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 295, H1033–H1043.

WONG WT, WONG SL, TIAN XT, HUANG Y (2010) Endothelial dysfunction: the common consequence in diabetes and hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 55:300–307

WRIGHT et al. Prostanoid receptor: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 281: R1343 R1360; 2001.

YANAGISAWA, M. et al. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca^{2+} channels. *Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension*, v. 6, n. 4, p. S188-91, dez. 1988.

YOSHITAKE, K. et al. Effects of 16 weeks of Treatment with Tibolone on Bone Mass and Bone Mechanical and Histomorphometric Indices in Mature Ovariectomized Rats with Established Osteopenia on a Low-Calcium Diet. *Bone*, v. 25, n. 3, p. 311–9, set. 1999.

YUNG LM, WONG WT, TIAN XY, LEUNG FP, YUNG LH, CHEN ZY, YAO X, LAU CW, H. Y. Inhibition of Renin-Angiotensin System Reverses Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress in Estrogen Deficient Rats. *Plos one*, v. 6, n. 3, p. 17437, 2011.

ZHANG,X.,LIU,J.,PANG,X.,ZHAO,J.,WANG,S.,ANDWU,D.(2014).Aldosterone inducesC-reactive protein expression. Via MR-ROS-MAPK-NF-kappaB signal path way in rat vascular smooth muscle cells. *Mol.Cell.Endocrinol.* 395,61–68. doi:10.1016/j.mce.2014.08.003.